

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**MÉCANISMES MOLÉCULAIRES ASSOCIÉS À L'ACTIVITÉ ANTI-TUMORALE
ET ANTI-ANGIOGÉNIQUE DU TLN-4601 SUR LES GLIOBLASTOMES ET
CELLULES ENDOTHÉLIALES CÉRÉBRALES HUMAINES**

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE**

PAR

MARTHA CAJINA

OCTOBRE 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Le travail de recherche présenté dans ce mémoire a été financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG). Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon directeur de recherche, le Dr. Borhane Annabi, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir procuré tous les moyens nécessaires au bon déroulement de mon travail. D'ailleurs, ce projet, en collaboration avec Thallion Pharmaceutiques, n'aurait jamais vu le jour sans son expertise unique en oncologie et ses compétences scientifiques. J'adresse également mes remerciements les plus sincères à ma co-directrice, le Dr. Henriette Gourdeau, qui a grandement contribué à l'amélioration du manuscrit en apportant de nombreuses idées scientifiques. Je voudrais également la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée dès le début de mes études supérieures et je suis particulièrement reconnaissante de l'accueil sympathique que son équipe de recherche m'a réservé et des précieux conseils qu'ils m'ont prodigués pour mener à bien mon travail. Mes remerciements vont aussi au personnel technique composé de Marie-Paule Lachambre, Ines Boufaïd, Julie Poirier et Isabelle Lavallé pour leur aide et leurs nombreux conseils. Je tiens à remercier mes collègues : Simon Fortier, Shanti, Simon Lord-Dufour, Carl, Asmaa et Karine pour l'ambiance agréable qui régnait dans le laboratoire et leur aide. J'adresse également des sincères remerciements au Dr. Nadia Boufaïd pour avoir patiemment corrigé cet ouvrage. Finalement, j'aimerais remercier ma famille pour leur amour et tout particulièrement mon mari, Roberto Acevedo, pour sa patience et son soutien tout au long de mes études.

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 LE CANCER	1
1.1.1 Définition.....	1
1.1.2 Épidémiologie.....	2
1.1.3 Facteurs de risque	2
1.1.4 Phénotypes tumoraux	3
1.2 LES TUMEURS CÉRÉBRALES.....	4
1.2.1 Classification des tumeurs cérébrales malignes.....	4
1.2.2 Les gliomes.....	5
1.2.3 Anomalies génétiques et mécanisme de tumorigénèse.....	5
1.2.4 Mutations du récepteur à l'EGF	7
1.3 ANGIOGÈNESE TUMORALE	9
1.3.1 Définition.....	9
1.3.2 Étapes du processus angiogénique.....	10
1.3.3 Signalisation cellulaire	11
1.4 TRAITEMENTS MÉDICAUX DES GLIOMES.....	12
1.4.1 Chirurgie.....	12
1.4.2 Chimiothérapie	12
1.4.3 Radiothérapie.....	13
1.5 TLN-4601	14
1.5.1 Développement.....	14
1.5.2 Sélectivité	14

1.5.3	Mode d'action connu jusqu'à ce jour	15
1.5.4	Évolution en essai clinique	16
1.6	OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	16
1.7	MODÈLES CELLULAIRES EXPÉRIMENTAUX.....	16

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
2.1 MATÉRIEL	26
2.2 MÉTHODES	27
2.2.1 Culture cellulaire	27
2.2.2 Viabilité cellulaire	27
2.2.3 Lyse cellulaire.....	28
2.2.4 Dosage des protéines selon la méthode de microBCA	28
2.2.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	28
2.2.6 Immunodétection des protéines	29
2.2.7 Extraction de l'ARN total.....	29
2.2.8 RT-PCR semi-quantitative.....	30
2.2.9 PCR en temps réel	30
2.2.10 Dosage de la caspase-3	30
2.2.11 Essai de migration cellulaire.....	30
2.2.12 Essai de tubulogénèse sur matrigel.....	31

CHAPITRE III	32
--------------------	----

RÉSULTATS	32
-----------------	----

3.1 ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU TLN-4601 SUR LES GLIOBLASTOMES	32
3.1.1 Validation des modèles cellulaires	32
3.1.2 Effet du TLN-4601 sur la viabilité cellulaire.....	34
3.1.3 Effet du TLN-4601 sur le phénotype infiltrant des glioblastomes	35
3.1.4 Effet du TLN-4601 sur la mort cellulaire des glioblastomes.....	37

3.2	ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU TLN-4601 SUR L'ENVIRONNEMENT TUMORAL DES GLIOBLASTOMES.	39
3.2.1	Effet du TLN-4601 sur le recrutement des cellules endothéliales au foyer tumoral.	39
3.2.2	Effet du TLN-4601 sur la tubulogénèse	41
3.3	CYTOTOXICITÉ SÉLECTIVE DU TLN-4601	41
3.3.1	Effet du TLN-4601 sur la mort des glioblastomes et des cellules endothéliales. ...	41

CHAPITRE IV

	DISCUSSION	59
4.1	POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE DU TLN-4601 SUR LES GLIOBLASTOMES HUMAINS.	59
4.1.2	TLN-4601 inhibe le phénotype infiltrant des glioblastomes humains.....	59
4.1.3	TLN-4601 induit l'apoptose des glioblastomes humains.	62
4.2	CARACTÉRISATION DE L'ACTION ANTI-ANGIOGÉNIQUE DU TLN-4601.....	64
4.2.1	TLN-4601 inhibe le recrutement des cellules endothéliales cérébrales au foyer tumoral.	64
4.2.2	TLN-4601 inhibe la tubulogénèse des cellules endothéliales cérébrales.....	67
4.3	SÉLECTIVITÉ THÉRAPEUTIQUE DU TLN-4601.....	67
4.3.1	Cytotoxicité sélective du TLN-4601 envers les cellules cancéreuses versus les cellules endothéliales.....	67
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	69
	BIBLIOGRAPHIE	71
	ANNEXE-A	78

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Phénotype infiltrant des gliomes.....	19
Figure 1.2 : Signaux de transduction cellulaire activés par le récepteur à l'EGF dimérique ou EGFRvIII.	21
Figure 1.3 : Représentation schématique du gène codant pour le récepteur à l'EGF.....	22
Figure 1.4 : Représentation linéaire du récepteur à l'EGF et de la forme mutée EGFRvIII. ..	23
Figure 1.5 : Étapes du processus d'angiogenèse tumorale.	24
Figure 1.6 : Structure moléculaire du TLN-4601.....	25
Figure 3.1 : Validation des modèles cellulaires par RT-PCR semi-quantitative et par PCR en temps réel.	43
Figure 3.2 : Validation des modèles par immunobuvardage de type Western.	44
Figure 3.3 : Effet du TLN-4601 sur la viabilité cellulaire des glioblastomes.	45
Figure 3.4 : Effet du TLN-4601 sur le potentiel infiltrant des glioblastomes.	46
Figure 3.5 : Effet du TLN-4601 sur la voie des MAPK chez les glioblastomes.	47
Figure 3.6 : Effet du TLN-4601 sur la voie des MAPK et la voie PI3K/AKT des glioblastomes.	48
Figure 3.7 : Effet du TLN-4601 sur la mort cellulaire des glioblastomes via un mécanisme d'apoptose dépendant.....	49
Figure 3.8 : Effet du TLN-4601 sur la mort cellulaire des glioblastomes via la voie PI3K/AKT.....	50
Figure 3.9 : Effet du TLN-4601 sur la voie de la PI3K/AKT dans les cellules endothéliales.....	51
Figure 3.10 : Effet du TLN-4601 sur la voie des MAPK dans les cellules endothéliales en présence de milieu conditionné à U87.	52
Figure 3.11 : Effet du TLN-4601 sur la migration des cellules endothéliales en présence de milieu conditionné à U87.	53
Figure 3.12 : Effet du TLN-4601 sur les niveaux d'expression d'ARNm du VEGF synthétisé par les glioblastomes parentaux.	54

Figure 3.13 : Effet du TLN-4601 sur les facteurs de croissances pro-migratoires sécrétés par les U87 MG.....	55
Figure 3.14 : Effet du TLN-4601 sur la formation de structures capillaires des cellules endothéliales.	56
Figure 3.15 : Toxicité préférentielle du TLN-4601 sur les cellules cancéreuses surexprimant PBR.....	57
Figure 3.15 : Modèle du mécanisme d'action du TLN-4601	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Grades des astrocytomes.	78
Tableau II: Récapitulatif de médicaments en essais cliniques ciblant les gliomes malins récurrents.	79
Tableau III: Séquence des amorces utilisées lors des RT-PCR ou de la qPCR.	80

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Aa	Acide aminé
Ac-DEVD-AFC	N-Acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorométhylcoumarin
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN _c	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT	Protéine kinase B
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BCA	Acide bicinchoninique
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes
BAD	Protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	Albumine bovine sérique
CE	Cellules endothéliales
c-Fos	Facteur de transcription c-Fos
CHAPS	3-[diméthylammonio]-1-propanesulfonate
c-Jun	Facteur de transcription c-Jun
CO ₂	Dioxyde de carbone
DMEM	Milieu minimum essentiel d'aigle
DTT	Dithiothréitol
ECL	Signal de chimiluminescence
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	Facteur de croissance de l'épithélium
EGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'épithélium
ELK-1	Facteur de transcription Elk-1
ERK	Kinase régulée par des signaux extracellulaires
FACS	Trieur de cellules par fluorescence
FAK	Kinase d'adhésion focale
SFB	Sérum fœtal bovin
SFBi	Sérum fœtal bovin inactivé
FKHR	Facteur de transcription forkhead
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GBM	Glioblastome multiforme
GGT	Gamma glutamyle transpeptidase
HBMEC	Cellules endothéliales cérébrales micro-vasculaires humaines
HIF-1	Facteur-1 induit par l'hypoxie
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose
IGF	Facteur de croissance de l'insuline
IkB	Inhibiteur kappa B
IKKB	Inhibiteur kappa B K bêta
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LDL	Lipoprotéines de basse densité
MAPK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes

MEK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes et activant ERK
MTT	[3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure]
NFκB	Facteur de transcription nucléaire kappa B
NP-40	Nonidet P-40
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PBR	Récepteur périphérique aux benzodiazépines
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PLCγ	Phospholipase C gamma
PMM	Potentiel membranaire mitochondrial
PMSF	Fluorure d'alpha-phényl méthyl sulfonyle
PTEN	Protéine homologue à la tensine délétée sur le chromosome 10
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
qPCR	PCR en temps réel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SV-40LT	Antigène large T du virus simien 40
TAE	Tampon Tris-acide acétique-EDTA
TBS	Tampons Tris salin
TBST	Tampons Tris salin contenant du tween-20
TEMED	N,N,N', N'-tétraméthylènediamine
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U87	Lignée cellulaire de glioblastome humain
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

RÉSUMÉ

Les glioblastomes (GBM) sont des tumeurs intracrâniennes caractérisées par une résistance très élevée aux thérapies classiques en raison d'un degré de néovascularisation accru et un phénotype extrêmement infiltrant. Malgré de nombreuses études menées à ce sujet, ce cancer du cerveau reste jusqu'à ce jour essentiellement incurable. Cet ouvrage traite de l'action moléculaire du TLN-4601, un nouvel agent anti-cancéreux capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et de s'accumuler de manière préférentielle au niveau de la tumeur. Ces propriétés ont permis au composé d'être reconnu comme traitement thérapeutique pour combattre les tumeurs cérébrales. Ce projet se veut donc être à l'interface entre la caractérisation moléculaire du mécanisme d'action et le ciblage thérapeutique de la molécule envers différentes lignées de GBM humains. Dans le but d'étudier l'effet thérapeutique du médicament sur les GBM, trois modèles cellulaires ont été utilisés soit les U87 MG, les U87 EGFRwt et les U87 EGFRvIII. L'amplification du récepteur à l'EGF (EGFR) de type sauvage et du récepteur tronqué EGFRvIII sont des anomalies génétiques communément observées chez ce type de tumeur. Ces phénotypes tumoraux sont notamment corrélés à la résistance des GBM aux traitements conventionnels de chimiothérapie. Le premier volet de cette étude a permis de déterminer que TLN-4601 antagonise le caractère infiltrant des glioblastomes en ciblant deux voies de signalisation associées au développement tumoral soit les voies de RAS/MAPK et de PI3K/AKT. Il a également été démontré que le médicament augmente la sensibilité des cellules tumorales à la mort cellulaire via un processus apoptotique impliquant une modulation à la baisse de la phosphorylation de BAD, une augmentation de l'activité caspasiq et un clivage de PARP. D'autre part, les résultats montrent que les U87 EGFRvIII semblent être plus réfractaires au médicament comparativement aux deux autres lignées à l'étude. Le second volet de l'étude a permis de caractériser les propriétés anti-angiogéniques du TLN-4601. Il a été établi que le composé inhibe le recrutement des cellules endothéliales (CE) au foyer tumoral en antagonisant leur potentiel migratoire, la tubulogénèse et la synthèse de VEGF par les glioblastomes, un des principaux messagers biochimiques impliqués dans l'angiogénèse. Cet effet pourrait résulter de l'inhibition par TLN-4601 des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT également observée chez les CE. Finalement, une action cytotoxique du médicament plus spécifique envers le compartiment cérébral tumoral par rapport à l'endothélium vasculaire semble être relevée. Cette action serait associée à la surexpression des récepteurs périphériques benzodiazépines (PBR), chez les glioblastomes comparativement aux cellules endothéliales. De manière globale, nous rapportons que l'action thérapeutique du TLN-4601 semble réduire la nature extrêmement infiltrante des glioblastomes et l'angiogénèse tumorale qui sont des événements indispensables à la progression des cancers cérébraux. De plus, la cytotoxicité préférentielle du médicament envers les tissus cancéreux plutôt que les tissus sains fait état de la sélectivité du produit. Ces effets thérapeutiques multiples répertoriés dans cette étude justifient son utilisation en tant qu'agent chimiothérapeutique dans la lutte contre le GBM.

Mots clefs : TLN-4601, glioblastomes, cellules endothéliales cérébrales, PI3K/AKT, RAS/MAPK, angiogénèse, invasion tumorale, apoptose.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Définition

Notre corps est composé d'environ 50,000 milliards de cellules qui représentent en fait la plus petite unité vivante de notre organisme. Elles possèdent un noyau, un compartiment cellulaire responsable de garder l'information génétique en sécurité (Voet et Voet, 2007). Cette information génétique est en grande partie responsable de ce que nous sommes. En effet, aussi incroyable que cela puisse paraître, cette information détermine la couleur de notre peau, celle de nos cheveux et même le risque plus ou moins grand un jour d'être atteint d'une maladie grave telle que le cancer. Au cours de l'embryogenèse, les cellules se différencient, se spécialisent et n'utilisent plus qu'une certaine partie de l'information génétique dans le but d'assurer leur survie et leur mort. Le processus pathologique de l'oncogénèse trouve son origine dans des changements génétiques qui permettent à une cellule d'acquérir des avantages de croissance et de survie par rapport aux autres cellules de l'organisme (Voet et Voet, 2007). Il est maintenant bien établi qu'en réponse à une agression génotoxique, les cellules entament un processus de réparation. Toutefois, lorsque l'ADN cellulaire est trop endommagé, les mécanismes de réparation sont court-circuités. Suite aux changements protéiques dictés par les multiples erreurs génétiques, les cellules peuvent adopter des comportements anarchiques. En fait, elles peuvent proliférer, se diviser de manière incontrôlée et devenir littéralement immortelles. L'origine du cancer réside donc dans l'accumulation d'une série de mutations somatiques ayant pour résultat un dérèglement de la croissance cellulaire normale (DeVita *et al.*, 2004). Pour éviter la formation de tumeur, une cellule génétiquement altérée provoquera sa propre mort, ce phénomène est également appelé l'apoptose. Toutefois, il arrive que les instructions relatives à la division et à la mort d'une cellule soient trop endommagées et empêchent par le fait même son entrée en apoptose. Habituellement, ces cellules anarchiques sont éliminées par le système immunitaire, néanmoins il arrive quelquefois qu'elles échappent à son contrôle et provoque un cancer (DeVita *et al.*, 2004). Les cellules cancéreuses évoluent à travers plusieurs altérations géniques séquentielles. Tout récemment, la génétique moléculaire des tumeurs cérébrales a été caractérisée. Cette dernière démontre que les altérations les plus fréquemment retrouvées dans les gliomes sont entre autres l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation de gènes supresseurs de tumeurs (Ohgaki, 2007).

1.1.2 Épidémiologie

Chaque année, près de 10 millions de nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués à travers la planète. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), cette valeur devrait augmenter à plus de 15 millions de nouveaux cas d'ici l'année 2020. Annuellement, le nombre de décès reliés au cancer est estimé à environ 6 millions ce qui représente approximativement 12 % de la mortalité planétaire. En dépit des énormes progrès et des milliards de dollars consacrés à la recherche, à la prévention et à la lutte contre le cancer, certains types de cancer tel que les tumeurs cérébrales ont provoqué le décès de 70 % des patients atteints de cette maladie en 2004 (Institut de Recherche en Santé du Canada, 2005). Les tumeurs cérébrales sont la première cause de mortalité liée au cancer chez les enfants et représente environ 25 % des cas pédiatriques (Jemal *et al.*, 2007). De plus, c'est également la troisième cause de mortalité liée au cancer chez les jeunes adultes âgés entre 20 et 39 ans (Jemal *et al.*, 2007). Le glioblastome multiforme (GBM) est le type de tumeur cérébrale primaire le plus répandu et le plus mortel (Zou *et al.*, 2007). Annuellement, aux États-Unis près de 12, 000 cas sont nouvellement diagnostiqués, la moitié des personnes mourront en 1 an et le reste dans un délai de 3 ans (Morgan, 2006). La recherche sur les tumeurs cérébrales s'avère donc une nécessité afin d'améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires de cette maladie. Ces connaissances nous permettront entre autres de poser plus rapidement un diagnostic précis et surtout de développer de nouvelles thérapies.

1.1.3 Facteurs de risque

Des données statistiques ont démontré que le cancer est une maladie qui touchera une personne sur trois avant l'âge de 75 ans et une personne sur quatre succombera aux complications liées à la maladie (Béliveau et Gingras, 2005). Certains facteurs augmentent le risque d'être un jour atteint du cancer. Parmi ceux-ci figurent le tabagisme, l'alimentation inadéquate, la consommation excessive d'alcool, les infections par les rétrovirus, les radiations, les habitudes de vie, la pollution environnementale et les prédispositions génétiques (Montesano et Hall, 2001). Les facteurs difficilement contrôlables, qu'ils soient d'origine héréditaire, environnementale ou virale, sont responsables de 30 % des cancers. À l'inverse, plusieurs facteurs directement liés au mode de vie comme le tabagisme, l'inactivité physique, l'obésité, l'alimentation déficiente, l'usage abusif des drogues et de l'alcool sont la cause directe du développement de 70% des cancers (Béliveau et Gingras, 2005). Tous ces facteurs peuvent provoquer une dérégulation des fonctions cellulaires, par la perte ou l'altération de certains mécanismes de réparation de l'ADN

ou par des mutations dans leur génome. Bien que les tumeurs cérébrales puissent toucher des personnes de tous âges, elles surviennent plus souvent chez les adultes entre 50 et 70 ans. Les rayons ionisants, l'affaiblissement majeur du système immunitaire, l'exposition en milieu de travail au chlorure de vinyle (une substance chimique entrant dans la composition des matières plastiques) et les prédispositions génétiques augmentent radicalement les risques de tumeur cérébrale. Toutefois, des tumeurs peuvent parfois se développer en l'absence de tous ces facteurs (Société Canadienne du Cancer, 2008).

1.1.4 Phénotypes tumoraux

L'un des concepts les plus importants en cancérologie est la distinction entre les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes, dites cancéreuses. La plupart des tumeurs sont des néoplasmes qui par définition sont des croissances cellulaires anormales relativement autonomes et transmises d'une cellule mère aux cellules filles. Une tumeur est bénigne lorsqu'elle est confinée à son foyer originel, c'est-à-dire qu'elle ne peut pas envahir les tissus environnants ou d'autres organes. Les tumeurs bénignes sont bien différenciées, grossissent peu, évoluent lentement, et n'envahissent que très peu les tissus avoisinants.

À l'inverse, les tumeurs malignes quant à elles, sont peu différenciées, croissent et évoluent rapidement. Elles peuvent également envahir les tissus adjacents et se disséminer dans les organes éloignés par voie sanguine ou lymphatique (DeVita *et al.*, 2004). Les néoplasmes malins secondaires formés à partir de la tumeur primaire sont appelés métastases. Le type tumoral n'est toutefois pas le seul critère d'innocuité. En fait, une tumeur histologiquement bénigne peut avoir une évolution grave si elle altère le fonctionnement d'un organe, si elle est diagnostiquée tardivement ou si son ablation chirurgicale est difficile. Inversement, une tumeur maligne peut avoir une évolution et des conséquences minimales sur l'état de santé d'un individu, en raison de sa nature ou de notre aptitude à la traiter. Statistiquement, environ 23% des tumeurs cérébrales diagnostiquées sont des tumeurs malignes (American Brain Tumor Association, 2004).

1.2 Les tumeurs cérébrales

1.2.1 Classification des tumeurs cérébrales malignes

Le but ultime de la classification anatomo-pathologique des gliomes est de définir leur type histologique et leur grade afin de poser un diagnostic précis et de proposer un traitement adapté au patient (Figarella-Branger et Bouvier, 2005). Jusqu'à présent plus de 120 types de tumeurs cérébrales ont été répertoriées, ce qui rend le traitement de cette maladie très complexe. Les astrocytomes pilocytaires, les épendynomes et les médulloblastomes sont les tumeurs intracrâniennes les plus fréquentes chez l'enfant, alors que chez l'adulte on retrouve davantage les tumeurs astrocytaires (incluant les astrocytomes anaplasiques et les glioblastomes), les oligodendrogliomes et les méningiomes (Collins, 2004). Il existe plusieurs classifications anatomo-pathologiques des tumeurs gliales, cependant le système internationalement le plus reconnu reste celui de l'OMS qui a été mis à jour en 2007 (Louis *et al.*, 2007). Ce système contient quatre paliers de classification, débutant du grade 1 au grade 4, représentant l'augmentation de la malignité des gliomes. Le degré de malignité est établi selon le comportement des tumeurs cérébrales. Les six principaux critères sont l'atypie (similarité de la cellule cancéreuse avec la cellule saine), la mitose, l'observation de croissance cellulaire incontrôlée, la présence de nécrose, le caractère invasif et la vascularisation tumorale (American Brain Tumor Association, 2004) (voir tableau I). La classification de l'OMS comporte malheureusement deux défauts majeurs. Elle ne prend notamment pas en compte l'hétérogénéité tumorale et ne fait pas de distinction entre les cellules cancéreuses et le parenchyme résiduel infiltré. Or les tumeurs gliales sont des lésions extrêmement hétérogènes et il est possible de trouver plusieurs grades évolutifs au sein d'une même lésion. D'ailleurs, il arrive qu'une simple biopsie ne suffise pas pour déterminer le grade le plus élevé. La classification française de Sainte-Anne a une meilleure fidélité, car elle intègre des données cliniques et d'imagerie en prenant compte des résultats de l'exploration par l'IRM (imagerie par résonance magnétique), ce qui permet de voir les signes de nécroses et de néovascularisation, spécifiques des tumeurs de grade élevé (Figarella-Branger et Bouvier, 2005).

1.2.2 Les gliomes

Au Canada, environ 10,000 nouveaux cas de tumeurs cérébrales sont diagnostiqués chaque année (Institut de Recherche en Santé du Canada,, 2005). Selon la Fondation canadienne des tumeurs cérébrales, au moins le tiers de ces cas sont des tumeurs primaires qui se forment à partir de cellules spécialisées constituant l'encéphale et ses enveloppes. Le glioblastome multiforme (GBM) est une tumeur à croissance rapide qui débute à partir des cellules gliales du système nerveux central, le plus souvent dans le cerveau. C'est le type de gliome ou tumeur cérébrale le plus répandu et le plus mortel (Zou *et al.*, 2007). Le GBM est plus courant chez les hommes et les personnes de race blanche. L'âge moyen des personnes qui reçoivent un diagnostic de GBM se situe entre 50 et 60 ans (Combs *et al.*, 2007). Les gliomes diffèrent d'autres tumeurs métastatiques, où l'invasion et la métastase se produisent habituellement tard dans la progression de la maladie (figure 1.1). Paradoxalement, bien que les gliomes semblent avoir une capacité illimitée pour l'invasion du cerveau, ils ne se métastasient presque jamais en dehors du système nerveux central (Mikkelsen *et al.*, 1998). Même si les glioblastomes sont des tumeurs non métastatiques, leur potentiel infiltrant est malheureusement la cause majeure de récurrence de cette maladie (Tsatas et Kaye, 2003).

1.2.3 Anomalies génétiques et mécanisme de tumorigénèse

L'accumulation de changements génétiques et la sélection de variants sont associées à l'évolution et la progression du cancer. Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur sont des éléments clef dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Dans le cas des cancers, les gènes suppresseurs de tumeurs peuvent être inactivés de différentes manières soit par mutation germinale, mutation somatique, délétion hétérozygote sur un chromosome ou par l'inactivation du gène via son promoteur (Etienne *et al.*, 2006). Les délétions chromosomiques sont les altérations génétiques les plus fréquemment observées chez les GBM. La perte d'hétérozygotie du bras long du chromosome 10 est observée dans 70 % des cas suggérant ainsi que cette portion d'ADN contient des gènes suppresseurs de tumeurs (Ohgaki, 2007). En effet, plusieurs gènes anti-oncogéniques ont été localisés à cet endroit, tel que celui codant pour la protéine homologue à la tensine déléetée sur le chromosome 10 (PTEN). En 1999, Myers et Tonks (Tonks et Myers, 1999) découvrirent que cette enzyme possédait, outre ses fonctions de protéine phosphatase, une capacité à déphosphoryler des lipides chargés

négativement. Cette hypothèse fut confirmée la même année par l'équipe de Dixon (Maehama et Dixon, 1999), qui fut la première à attribuer à PTEN une activité de lipide phosphatase. Il est maintenant clairement établi que cette phosphatase régule négativement l'activation oncogénique de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Ohgaki, 2007). L'action enzymatique de PTEN consiste à déphosphoryler sa cible, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) pour le convertir en phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2). Son rôle est donc antagoniste à celui de la PI3K dont la fonction est d'ajouter un groupement phosphate en position 3 des phosphoinositols pour former du PIP3. Le PIP3 est le second messenger d'une voie de transduction cellulaire majeure qui active la kinase AKT et aboutit à la protection des cellules tumorales vis-à-vis l'apoptose. Ainsi, la conversion de PIP3 en PIP2 par la phosphatase PTEN inactive la voie oncogénique PI3K/AKT, ce qui se traduit au niveau cellulaire par un arrêt de la croissance et une entrée en apoptose.

PTEN est une protéine aux multiples fonctions. Son activité phosphatase lui permet également de déphosphoryler des protéines sur des résidus tyrosine, sérine ou thréonine. Cette activité de protéine phosphatase permet à l'enzyme d'inhiber la voie MAPK, ainsi que la voie FAK (kinase d'adhésion focale), agissant de ce fait sur les interactions de la cellule avec la matrice extracellulaire, ce qui lui confère un rôle dans les mécanismes invasifs. Agissant simultanément sur la morphologie et la prolifération des cellules tumorales, PTEN se voit donc attribuer un rôle majeur de suppresseur de tumeurs (Hlobilkova *et al.*, 2003).

Dans plusieurs types de tumeurs, dont les GBM, l'altération du gène PTEN conduit à l'activation constitutive de la voie oncogénique de la PI3K. Ce changement génétique permet d'activer un certain nombre d'effecteurs impliqués dans les processus d'invasion, de métastase, d'angiogenèse, de prolifération, de différenciation, de survie cellulaire et d'organisation du cytosquelette (Berrie, 2001). Le principal effecteur est la kinase AKT qui existe sous trois isoformes (AKT1, 2, 3). Cette enzyme possède un domaine kinase central, un domaine PH-pleckstrine nécessaire aux interactions protéines-protéines ou protéines-lipides en position N-terminale et un domaine Tail en position C-terminale. L'activation de cette kinase requiert plusieurs modifications post-traductionnelles. Ce processus débute lorsque les seconds messagers engendrés par la PI3K se fixent au domaine PH de la kinase AKT, entraînant une délocalisation de l'enzyme du cytoplasme à la face interne de la membrane cellulaire. La fixation du complexe kinase PDK1-PRK2 engendre une modification de conformation favorisant sa phosphorylation par PDK1. Finalement, la forme active d'AKT phosphoryle plusieurs protéines cytoplasmiques

dont un certain nombre sont impliquées dans le processus apoptotique. AKT favorise notamment la phosphorylation de Bad. La forme phosphorylée de Bad devient inactive et s'associe dans le cytoplasme à la protéine chaperonne 14-3-3, ce qui a pour conséquence de dissocier le complexe Bad/Bcl-X_L de la face interne de la mitochondrie. La forme monomérique de Bcl-X_L peut ainsi s'opposer à l'entrée en apoptose de la cellule et favoriser la survie tumorale (DeVita *et al.*, 2004). AKT peut également moduler l'expression de gènes impliqués dans l'exécution de l'apoptose en neutralisant les membres de la famille des facteurs de transcription forkhead (FKHR). FKHR une fois phosphorylé subit le même sort que pBad, il est séquestré dans le cytoplasme par la protéine chaperonne 14-3-3. De plus, AKT dissocie le complexe IKB/NFκB en activant la kinase IKKB, ce qui induit la dégradation de IKB par le protéasome suite à son ubiquitination. Le facteur de transcription NFκB ainsi libéré induit la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire en codant des protéines telles la famille Bcl-2 et les inhibiteurs de caspases (IAP) (Stambolic *et al.*, 1998).

L'amplification du récepteur à l'EGF (facteur de croissance épidermique) qu'il soit muté ou de type sauvage est la deuxième anomalie génétique la plus observée chez les GBM et représente 36 % des cas (Ohgaki, 2007). La voie des MAPK, qui constitue l'une des voies principales de transmission des signaux de prolifération et de survie apportés par les facteurs de croissance, fera l'objet de cette présente étude (Ziegler *et al.*, 2008). Après dimérisation de EGFR, la voie des MAPK par l'intermédiaire de protéines adaptatrices est activée par certains membres de la famille RAS qui sont à l'origine de la cascade de phosphorylation. Initialement, RAS interagit avec la kinase RAF et l'active. Ensuite, RAF active les kinases MEK. Ces protéines vont à leur tour phosphoryler les kinases ERK. Finalement, ces dernières induiront soit la phosphorylation de diverses cibles cytoplasmiques ou activeront plusieurs facteurs de transcription responsables de la réplication de l'ADN et de la mise en route du cycle cellulaire tels que c-Fos, c-Jun et ELK-1 (May et Hill, 2008). Les médicaments anti-cancéreux affectant la voie des MAPK en ciblant tout particulièrement RAS et RAF sont des nouvelles avenues thérapeutiques explorées pour le développement de nouveaux médicaments.

1.2.4 Mutations du récepteur à l'EGF

Plusieurs récepteurs protéiques à activité tyrosine kinase sont connus pour être impliqués dans le développement de nombreux cancers et ont été validés en tant que cibles thérapeutiques (Ziegler *et al.*, 2008). L'amplification du récepteur à l'EGF (EGFR) est corrélée au degré de

malignité de plusieurs cancers tels que les gliomes, les carcinomes pulmonaires, ovariens et ceux de la prostate. Son expression concomitante avec celle de son ligand, le facteur de croissance de l'épithélium (EGF), par les cellules tumorales suggèrent l'existence d'une boucle autocrine ou paracrine favorisant la tumorigenèse (Tang, Steck et Yung, 2007). Chez les patients atteints de GBM, l'amplification de la protéine EGFR a été observée dans 36 % des cas (Ohgaki, 2007). La surexpression de ce récepteur dans les premiers stades de formation des GBM suggère que cette enzyme joue un rôle clef dans la gliomagenèse. En fait, ce récepteur active plusieurs voies de signalisation intracellulaire incluant celles des MAPK, de la PI3K et de la PLC γ (figure 1.2). Ces voies de transduction cellulaire sont responsables de réguler plusieurs fonctions cruciales, dont la prolifération, la survie, la migration, la signalisation calcium-dépendante et la stimulation de cytokines (Ziegler *et al.*, 2008).

C'est dans les années 80 que l'équipe de Cohen a découvert la glycoprotéine EGFR et a évalué son poids moléculaire à 170 KDa (Cohen *et al.*, 1982). Durant le processus d'amplification du récepteur, il arrive souvent des réarrangements d'ARNm par l'épissage alternatif, ce qui génère plusieurs variantes de la protéine (figure 1.3). Les délétions les plus fréquemment retrouvées se localisent dans la portion extracellulaire du récepteur codée par les exons 1 à 14. Ces mutations génèrent des variantes tronquées qui sont constitutivement actives (Mellinghoff *et al.*, 2005) et pour lesquelles le signal d'internalisation et de dégradation sont atténués (Grandal *et al.*, 2007). Elles confèrent aux cellules cancéreuses un avantage au niveau de leur survie et de leur prolifération par rapport aux cellules saines. La délétion du domaine VIII correspondant aux exons 2 à 7 de la protéine (figure 1.3) est la plus couramment observée et survient dans 60 % des cas de GBM (Pao et Miller, 2005).

La protéine EGFRvIII a rapidement suscité un très grand engouement dans la communauté scientifique, puisqu'en plus d'être associée au phénomène de résistance à certains agents chimiothérapeutiques (Nagane *et al.*, 1998), cette protéine est exprimée exclusivement dans les tissus tumoraux et constitue de ce fait une cible thérapeutique intéressante. En 1987, Haley et collaborateurs ont publié la structure complète exons-introns du gène EGFR humain. Ce gène, composé de 26 exons (figure 1.3), est localisé sur le bras du chromosome 7p11-13 (Haley *et al.*, 1987). Dans un contexte physiologique, l'activation du récepteur s'effectue via les domaines vI et vIII qui forment une poche de liaison pour le ligand. Le complexe récepteur-ligand entraîne la dimérisation du récepteur suite à un changement conformationnel et induit une activité tyrosine kinase codée par les exons 16 à 22 ainsi qu'une autophosphorylation intrinsèque sur certains

résidus tyrosines (figure 1.4). L'activité tyrosine kinase permet au récepteur de phosphoryler plusieurs protéines cytoplasmiques cibles et de déclencher par le fait même des signaux de prolifération. L'autophosphorylation d'EGFR, quant à elle, déploie des sites de liaisons pour des protéines présentant des domaines d'homologie SRC-2 (SH2) ou des domaines de liaison de phosphotyrosines (PTB) ce qui active des voies de survie cellulaire. D'un autre côté, l'autophosphorylation au niveau de la région CAIN (située entre l'aa 974-1021) (figure 1.4) du domaine C-terminal permet d'internaliser et de dégrader EGFR suite à son activation (Pedersen *et al.*, 2001). Ce mécanisme de rétro-inhibition est cependant aboli chez le mutant EGFRvIII. L'envoi de signaux d'autophosphorylation est relativement bas ce qui déclenche les voies de transduction cellulaire sans toutefois exposer les séquences phosphorylées menant à l'endocytose du récepteur (Tang, Steckel Yung, 1997).

L'amplification du gène EGFR ainsi que de la forme mutée EGFRvIII sont des anomalies génétiques associées à un pronostic très sombre pour les patients atteints de GBM. En effet, une étude clinique a rapporté que la médiane de survie des patients atteints d'une tumeur EGFRvIII positive était de $4,5 \pm 0,6$ mois comparativement à $11,2 \pm 0,9$ mois pour les patients EGFRvIII négatif (Feldkamp *et al.*, 1999). Les médicaments ciblant EGFR ont démontré être de traitements pertinents pour certains types de cancer. Cependant, un grand nombre de patients sensibles aux traitements développe une résistance aux effets du médicament. Ces protéines sont toutes deux des cibles thérapeutiques raisonnables pour le traitement des GBM, une maladie qui reste malencontreusement jusqu'à ce jour incurable et mortelle.

1.3 Angiogénèse tumorale

1.3.1 Définition

L'angiogénèse est un procédé complexe et étroitement contrôlé menant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus crucial intervient non seulement lors de l'embryogenèse, mais également tout au long de la vie, car il est impliqué dans les processus de réparation tels que la cicatrisation, le remodelage tissulaire et lors des changements endométriaux du cycle menstruel (O'Reilly *et al.*, 1996; Hyder et Stancel, 1999; Liekens, De Clercq et Neyts, 2001). Au cours de l'angiogénèse physiologique, les vaisseaux sanguins deviennent rapidement matures et se stabilisent, ce qui se traduit par un retour à l'équilibre entre les inducteurs et les inhibiteurs de l'angiogénèse. Cependant, lorsque cet

équilibre est perturbé, une néovascularisation incontrôlée se déclenche menant inévitablement à diverses pathologies. La surexpression de facteurs anti-angiogéniques peut mener à des états pathologiques tels que l'Alzheimer, l'athérosclérose, la maladie de Crohn, l'emphysème et l'hypertension artérielle. À l'inverse, la surproduction d'inducteurs angiogéniques peut entre autres induire le psoriasis, la rétinopathie diabétique, l'asthme, l'arthrite rhumatoïde et le cancer (Carmeliet, 2003).

L'angiogénèse tumorale fut rapportée pour la première fois dans les années 70 par le Dr. Judah Folkman. Cette découverte majeure a ouvert un nouveau volet dans la lutte contre le cancer. D'ailleurs, de nos jours ce phénomène est l'un des champs de recherche les plus étudiés en oncologie. Plus de 60 composés anti-angiogéniques sont actuellement en cours d'évaluation clinique en phase I ou II et plus de 12 agents ont atteints ou terminés les essais de phase III (Kerbel, 2001, Scappaticci, 2002). Les travaux de Folkman ont démontré à la communauté scientifique qu'une tumeur atteignant une taille critique de 1 à 2 mm³ ne peut poursuivre sa croissance sans le développement d'un nouveau réseau vasculaire (Ausprunk et Folkman, 1977). En d'autres termes, il a postulé que l'angiogénèse tumorale est indissociable de la croissance tumorale. Une tumeur de cette taille ne peut plus croître, car elle entre dans état hypoxique, c'est-à-dire qu'elle manque d'oxygène. Afin de corriger ce déficit en oxygène, les cellules cancéreuses mettent en branle leur machinerie transcriptionnelle et synthétisent le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1) qui active à son tour des gènes pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et son récepteur VEGFR (Semenza, 2002). En plus, d'approvisionner les cellules tumorales en oxygène et en nutriment, l'angiogénèse permet également à la tumeur de devenir localement invasive et faciliterait par le fait même sa dissémination métastatique via la circulation sanguine ou lymphatique (Noel *et al.*, 2004).

1.3.2 *Étapes du processus angiogénique*

Les étapes de l'angiogénèse tumorale sont très similaires à celles impliquées dans l'angiogénèse physiologique. La différence majeure entre ces deux phénomènes est que les vaisseaux sanguins lors du développement du cancer ne retournent pas à leur état quiescent, ce qui se traduit par une croissance constante des réseaux vasculaires (Scoazec, 2000). Les procédés associés à l'angiogénèse nécessitent la participation coordonnée de plusieurs joueurs importants, menant entre autres à la prolifération des cellules endothéliales ainsi qu'à leur migration et à leur différenciation en structure de type capillaire. Au cours de la première étape de recrutement des

cellules endothéliales, diverses molécules angiogéniques, comme le b-FGF et le VEGF, sont sécrétées par les cellules tumorales et diffusent à travers le tissu pour atteindre les vaisseaux (figure 1.5).

Ces molécules angiogéniques stimulent la production de collagénases et de l'activateur du plasminogène par les cellules endothéliales, permettant ainsi la dégradation de la membrane basale entourant le vaisseau. Les cellules endothéliales peuvent alors migrer vers la source du stimulus et amorcer le bourgeonnement du vaisseau parental. Par la suite, les cellules prolifèrent rapidement pour permettre aux vaisseaux de prendre de l'expansion. La synthèse de composantes de la matrice extracellulaire par les cellules endothéliales des nouveaux vaisseaux permet le remodelage du réseau capillaire (Karamysheva, 2008). Ces vaisseaux formés durant l'angiogenèse tumorale diffèrent de ceux formés lors du processus non pathologique. Il a été rapporté qu'ils sont de formes irrégulières dilatés, tortueux et possèdent une organisation chaotique (Bergers et Benjamin, 2003).

1.3.3 Signalisation cellulaire

Plusieurs évidences suggèrent que le VEGF est l'inducteur le plus important de l'angiogenèse tumorale chez le gliome malin (Plate et Risau, 1995). Il a également été rapporté que la concentration protéique de VEGF chez les gliomes est étroitement corrélée avec le degré de vascularisation régulé à la hausse chez les glioblastomes (gliomes de haut grade) (Hatva et al, 1995). Cette molécule fortement sécrétée en condition d'hypoxie aussi bien par les cellules normales que les cellules tumorales (Tonini, Rossi et Claudio, 2003), est également reconnue comme un puissant mitogène pour les cellules endothéliales (Arenberg, 1999). Ce facteur de croissance se lie spécifiquement à deux récepteurs tyrosine kinase VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (Kdr-F1K-1) qui sont exprimés à la surface des cellules endothéliales. La liaison du ligand à ses deux récepteurs entraîne d'une part, une cascade de signaux mitotiques via VEGFR-2 et d'autre part des signaux migratoires via les deux types de récepteurs (Plate et Risau, 1995). Cependant, la présence d'autres agents pro-angiogéniques semble être nécessaire pour induire le phénomène d'angiogenèse. En effet, il a été démontré qu'une synergie entre le VEGF et le b-FGF est essentielle pour induire l'angiogenèse *in vivo* (Pepper *et al.*, 1997). Puisque la néovascularisation des tumeurs cérébrales est un événement obligatoire dans la progression du cancer, les inhibiteurs angiogéniques semblent être des outils thérapeutiques prometteurs dans le traitement des tumeurs malignes.

1.4 Traitements médicaux des gliomes

1.4.1 Chirurgie

Les glioblastomes sont parmi les tumeurs malignes les plus agressives. En l'absence de traitement, la médiane de survie des patients n'excède pas 3 mois (Krex *et al.*, 2007). L'exérèse chirurgicale est le traitement le plus fréquent des tumeurs cérébrales. Après cette intervention, l'espérance de survie augmente légèrement et peut atteindre environ 4 à 6 mois à partir de l'intervention (Garfield, 1986). La chirurgie des glioblastomes apporte trois avantages, elle permet un diagnostic histologique fiable, une décompression cérébrale et réduit la masse tumorale. Les tumeurs, tout comme la chirurgie, peuvent grandement endommager le tissu cérébral normal et engendrer divers troubles neurologiques. La chirurgie a cependant ses limites. Elle ne peut être pratiquée lorsque les tumeurs sont localisées dans une zone fonctionnelle importante du cerveau (Mikkelsen *et al.*, 1998). De plus dans la presque totalité des cas, le retrait de la masse tumorale lors de la chirurgie n'est pas complet. Il reste donc en place un nombre important de cellules tumorales qui sont sources de récidives (Stummer *et al.*, 2006). Cependant tout récemment l'équipe de Stummer a démontré qu'une résection plus complète des tumeurs opérables est possible lorsque la chirurgie est guidée par une coloration fluorescente à l'acide 5-aminolévulinique.

1.4.2 Chimiothérapie

Une des grandes stratégies mises sur pied pour combattre les glioblastomes est la chimiothérapie qui, couplée à la chirurgie, permet d'augmenter l'espérance de survie des patients de 6 à 12 mois (Mikkelsen *et al.*, 1998). Les agents chimiothérapeutiques présentement disponibles sur le marché sont très toxiques, toutefois en raison de leur manque de sélectivité ces traitements sont administrés à une dose susceptible de détruire la tumeur, sans pour autant constituer une menace vitale pour le patient. En d'autres termes, la chimiothérapie est limitée par l'absence ou l'insuffisance de sélectivité vis-à-vis des cellules ou des tissus tumoraux. De nos jours, la recherche développe des médicaments plus ciblés qui sont directement livrés au foyer tumoral. Malheureusement, de nombreuses tumeurs sont insensibles ou peu sensibles aux agents chimiothérapeutiques. Chez les tumeurs cérébrales, on distingue deux types de résistances soit la résistance naturelle et la résistance acquise. La première réside dans l'insensibilité d'une tumeur à

une drogue avec laquelle elle n'a jamais été en contact, tandis que la seconde se développe suite à des traitements. La résistance à la chimiothérapie qu'elle soit innée ou acquise est l'obstacle majeur à l'efficacité de ce traitement. De plus, elle est également la cause de la récurrence quasi inéluctable des tumeurs cérébrales entre le 5^e et 7^e cycle de chimiothérapie (Follézou et Pouillart, 1980). Pour les astrocytomes récurrents à haut grade, en particulier les GBM, divers agents sont présentement en essais cliniques de phase II. Toutefois, seulement quelques agents démontreront un potentiel thérapeutique assez important pour se rendre en phase III (tableau II). Les résultats des essais cliniques, menés très souvent dans les glioblastomes en récurrence, ont été généralement décevants. La combinaison de ces nouvelles molécules entre elles ou avec la radiothérapie sera probablement nécessaire pour mettre en évidence un effet thérapeutique.

1.4.3 Radiothérapie

La radiothérapie reste un traitement de référence pour combattre les glioblastomes. Ce traitement post-opératoire à la dose de 50 à 60 grays, fait passer la médiane de survie des patients de 8 à 10 mois (Reagan *et al.*, 1976). La radiothérapie est également limitée à la dose totale qu'il est possible de délivrer au niveau de l'encéphale sans risque grave pour les tissus nerveux. Selon la littérature, le pronostic sombre des patients serait lié à une résistance de ces tumeurs aux rayonnements ionisants. Selon les travaux de Bao et collaborateurs, les cellules souches cancéreuses présentes dans la tumeur seraient plus spécifiquement responsables de cette résistance (Bao *et al.*, 2006). Ces cellules, qui représentent environ 3 % de la population cellulaire d'une tumeur, possèdent une dangerosité plus accrue en raison de leur potentiel de reproduction presque infini. D'autre part, elles seraient également activement impliquées lors du processus d'angiogenèse tumorale, une étape critique de la progression du cancer (Yao *et al.*, 2008).

Il n'en reste pas moins que les résultats modestes obtenus par une approche pluridisciplinaire associant la résection chirurgicale maximale de la tumeur, suivie d'une radiothérapie et d'un traitement concomitant de chimiothérapie justifient le développement d'armes nouvelles. En effet, la découverte de nouvelles molécules actives pourrait contribuer à de nouveaux progrès, car malheureusement jusqu'à aujourd'hui les tumeurs cérébrales sont reconnues comme étant une maladie incurable qui progresse de manière drastique dans les 6 mois suivant son diagnostic (Garfield, 1986).

1.5 TLN-4601

1.5.1 Développement

Les activités de découverte de médicaments de Thallion Pharmaceutiques sont axées sur des composés produits naturellement par des bactéries appelées actinomycètes. Ces procaryotes non pathogènes vivent pour la plupart dans notre environnement, ils sont les principaux acteurs de la vie des sols. Leur morphologie est très similaire à celles des mycètes. Une des raisons pour lesquelles Thallion Pharmaceutiques a ciblé tout particulièrement ce micro-organisme pour bâtir sa plate forme bioinformatique est que ces bactéries constituent depuis plus de 50 ans, une source très importante de médicaments (Bentley *et al.*, 2002). En fait, elles sont les principales productrices d'antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire. De plus, le génome de ces micro-organismes compte un nombre restreint de gènes lequel varie entre 2,000 à 8,000 gènes selon l'espèce bactérienne (Bentley *et al.*, 2002). En plus des « gènes d'entretien » nécessaires à la croissance, au métabolisme et à la reproduction des bactéries, ces micro-organismes produisent également des composés bioactifs dont la synthèse est déterminée par un ensemble de gènes spécialisés. Thallion Pharmaceutiques a donc créé un nouveau paradigme pour découvrir des médicaments à partir de ces ensembles de gènes spécialisés. En d'autres termes, cette technologie exclusive de génomique et de bio-informatique évite de procéder à un criblage effectué au hasard et permet plutôt d'identifier de nouveaux médicaments potentiels grâce au balayage du génome des souches d'actinomycètes. Ce processus de développement de médicament, qui permet de passer des gènes aux molécules, est appelé *in silico*. En 2006, grâce à cette technologie innovatrice Thallion Pharmaceutiques a breveté le TLN-4601, un nouveau médicament naturel démontrant un potentiel à traiter de multiples tumeurs solides (US2006/0079508 A1).

1.5.2 Sélectivité

Le TLN-4601, comme d'autres agents chimiothérapeutiques (doxorubicine, cépharanthine et mitomycine C), est un composé cytotoxique provenant d'un micro-organisme non pathogène (Dorr et Liddil, 1991, Nakajima *et al.*, 2004). Le plus grand défaut de la chimiothérapie actuelle est son manque de sélectivité. En fait, la plupart des agents chimiothérapeutiques présentement disponibles sur le marché s'attaquent aussi bien aux cellules saines qu'aux cellules cancéreuses ce qui engendre de nombreux effets secondaires. La recherche

visé donc à développer des médicaments plus ciblés qui sont directement délivrés au foyer tumoral. Le TLN-4601 s'inscrit dans cette nouvelle génération de médicaments anti-cancéreux plus spécifiques. En effet, des données pré-cliniques ont démontré que cette petite molécule farnésylée se lie de manière sélective au récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), une protéine surexprimée dans différents types de tumeurs (Decaudin, 2004). Cette liaison sélective conférerait au médicament une action cytotoxique plus spécifique aux tissus cancéreux qu'aux tissus sains. Une étude *in vivo* réalisée à l'aide de modèles orthotopiques a démontré que la drogue s'accumule préférentiellement au niveau de la tumeur cérébrale comparé au cerveau sain dans un rapport 200 pour 1 (Gourdeau, *et al.*, 2007).

D'autre part, le TLN-4601 possède des propriétés physico-chimiques favorisant sa pénétration dans le système nerveux (figure 1.6). La liposolubilité, le faible poids moléculaire et le caractère non ionisé du médicament lui permettent de franchir aisément la barrière hémato-encéphalique (BHE). Après avoir administré par voie intraveineuse TLN-4601 chez des modèles xénogreffes de souris, celui-ci est détecté au niveau cérébral suite à une analyse par HPLC-MS/MS (Gourdeau *et al.*, 2007). Cette propriété a permis au composé d'être reconnu comme traitement pour combattre les cancers du cerveau. D'ailleurs, Thallion Pharmaceutiques poursuit un essai clinique de phase II qui vise à évaluer le TLN-4601 comme monothérapie de deuxième ligne chez des patients atteints de GBM.

1.5.3 Mode d'action connu jusqu'à ce jour

La plupart des médicaments utilisés en cancérologie ont été développés pour inhiber une cible thérapeutique. Cependant, la méthode de conception du TLN-4601 ne correspond pas au canevas habituel. Suite à sa découverte *in silico*, le composé a été testé pour différents paramètres *in vitro* et *in vivo* tels que le spectre d'activité, la sélectivité, le potentiel d'activité et l'innocuité afin de valider son action anticancéreuse. Ce mode de découverte, qui est basé sur le potentiel thérapeutique de la molécule, n'offre malheureusement aucun renseignement sur son mode d'action. D'ailleurs, la présente étude a pour objectif principal d'étudier les voies de transduction cellulaire affectées par le médicament chez les glioblastomes. Des données précliniques suggèrent que le TLN-4601 inhibe de manière efficace les voies de signalisation RAS-MAPK. La molécule anticancéreuse semble agir au centre de ces voies de signalisation chez plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, en inhibant l'activation de RAS et en entraînant ainsi l'inhibition des événements intracellulaires en aval.

1.5.4 Évolution en essai clinique

Le TLN-4601 a été breveté en 2004 (brevet 7101872) et les essais cliniques ont débuté l'année suivante. Thallion Pharmaceutiques a récemment complété avec succès un essai clinique de Phase I/II évaluant le profil pharmacologique, l'innocuité et l'efficacité anti-tumorale du composé comme traitement chez des patients atteints d'un cancer réfractaire de stade avancé. La portion à dosage croissant inclut des patients atteints d'un cancer du côlon, de l'ovaire, du duodénum et d'un gliome. Le TLN-4601 s'est avéré sûr et bien toléré. Parmi 7 patients ayant complété 6 cycles de traitement ou plus, quatre ont démontré une stabilisation de leur cancer. Au cours de la seconde portion de l'essai, 12 patients additionnels ont été traités à la dose maximale, telle que déterminée au cours de la première portion de l'étude, dans le but de recueillir des données supplémentaires sur le profil d'innocuité et la pharmacocinétique du composé ainsi qu'une indication préliminaire de son efficacité clinique. La Thallion Pharmaceutiques a récemment débuté un essai clinique de Phase II qui vise à évaluer TLN-4601 comme monothérapie de deuxième ligne chez des patients atteints de GBM.

1.6 Objectifs de la recherche

Des données précliniques suggèrent que l'action anticancéreuse du TLN-4601 est associée à sa capacité à cibler la voie des MAPK, toutefois son action n'a pas été documentée chez les tumeurs cérébrales. Il est clairement établi que l'amplification d'EGFR et celle de ses formes mutantes sont des anomalies génétiques associées au développement de ces tumeurs et à leur résistance envers certains agents chimiothérapeutiques. Le projet vise donc dans un premier temps à déterminer le ciblage thérapeutique du TLN-4601 envers les trois modèles de glioblastomes humains soit les U87 MG, U87 EGFRwt (mimant les GBM surexprimant EGFR) et U87EGFRvIII (mimant les GBM surexprimant la forme mutée). Le but de cette étude est non seulement d'étudier l'effet thérapeutique du composé sur ces lignées cancéreuses, mais également d'étudier son mode d'action au niveau moléculaire. Dans un deuxième temps, le projet consistera également à évaluer l'effet du médicament sur la néovascularisation de ces cellules astrocytaires. Les résultats de cette recherche permettront entre autres à Thallion Pharmaceutiques d'optimiser les approches thérapeutiques du médicament et de mieux orienter les essais cliniques en fonction du profil génétique des patients.

1.7 Modèles cellulaires expérimentaux

Le récepteur à l'EGF possède une activité tyrosine kinase reconnue pour être impliquée dans l'évolution des GBM (Ziegler *et al.*, 2008). Des données précliniques suggèrent que l'action anti-cancéreuse du TLN-4601 est associée à sa capacité à cibler la voie des MAPK, fortement induite suite à l'amplification de l'EGFR. Durant ce processus d'amplification, il arrive souvent des réarrangements dans l'ARNm, ce qui génère plusieurs variantes de la protéine. La délétion génétique la plus fréquemment retrouvée est celle du domaine VIII du récepteur. Cette délétion génère une variante tronquée au niveau extracellulaire qui est constitutivement active (Mellinghoff *et al.*, 2005) et pour laquelle le signal d'internalisation et de dégradation est atténué (Grandal *et al.*, 2007). Puisque l'amplification du EGFR ainsi que de la forme mutée EGFRvIII sont des phénotypes tumoraux que les glioblastomes primaires perdent rapidement en culture, l'équipe scientifique de Nishikawa a donc infecté des cellules U87 MG avec des virus portant soit le gène EGFRwt ou le gène EGFRvIII ainsi que celui de la résistance à la généticine (G418) dans le but de maintenir des niveaux d'expression de récepteurs comparables à ceux d'une tumeur cérébrale (Nishikawa *et al.*, 1994). Ils ont aussi démontré que la capacité tumorigène de ces lignées recombinantes augmente considérablement suite à leur implantation chez des souris nu/nu par voie sous-cutanée ou intracérébrale (Nishikawa *et al.*, 1994). Ces lignées cellulaires gliales s'avèrent donc être des modèles expérimentaux pertinents pour étudier la capacité du TLN-4601 à inhiber la voie de signalisation MAPK.

TLN-4601 a la capacité de traverser la BHE et à s'accumuler de manière préférentielle au niveau de la tumeur. Les cellules endothéliales cérébrales micro-vasculaires (HBMEC) qui sont la principale constituante de la BHE vont donc nous servir de modèle pour étudier l'effet du TLN-4601 sur la néovascularisation des tumeurs gliales. Le matériel pour l'isolement des HBMEC est habituellement obtenu à partir d'un spécimen temporel de lobectomie, qui en raison de leur petite taille, nécessite souvent la transformation et l'immortalisation de ces cellules (Nag, 2003). Les HBMEC utilisés dans le cadre de cette étude ont été caractérisés par le Dr. Kwang Sik Kim de l'école de médecine de l'université de Johns Hopkins (Baltimore, MD). L'expression de plusieurs marqueurs endothéliaux tels que le facteur VIII-Rag, l'anhydrase carbonique IV et l'ulx européen agglutinine a été confirmée. De plus, une diminution de la fluorescence des lipoprotéines acétylées à faible densité (LDL) et de la gamma glutamyle transpeptidase (GGT) marquées témoigne du phénotype de cellules endothéliales cérébrales (Stins, Gilles et Kim, 1997). Les HBMEC ont été immortalisées après infection par des rétrovirus recombinants simien

antigène grand T (SV-40LT). Selon la littérature, ces cellules endothéliales maintiennent leurs caractéristiques fonctionnelles et morphologiques pendant 30 passages (Greiffenberg *et al.*, 1998).

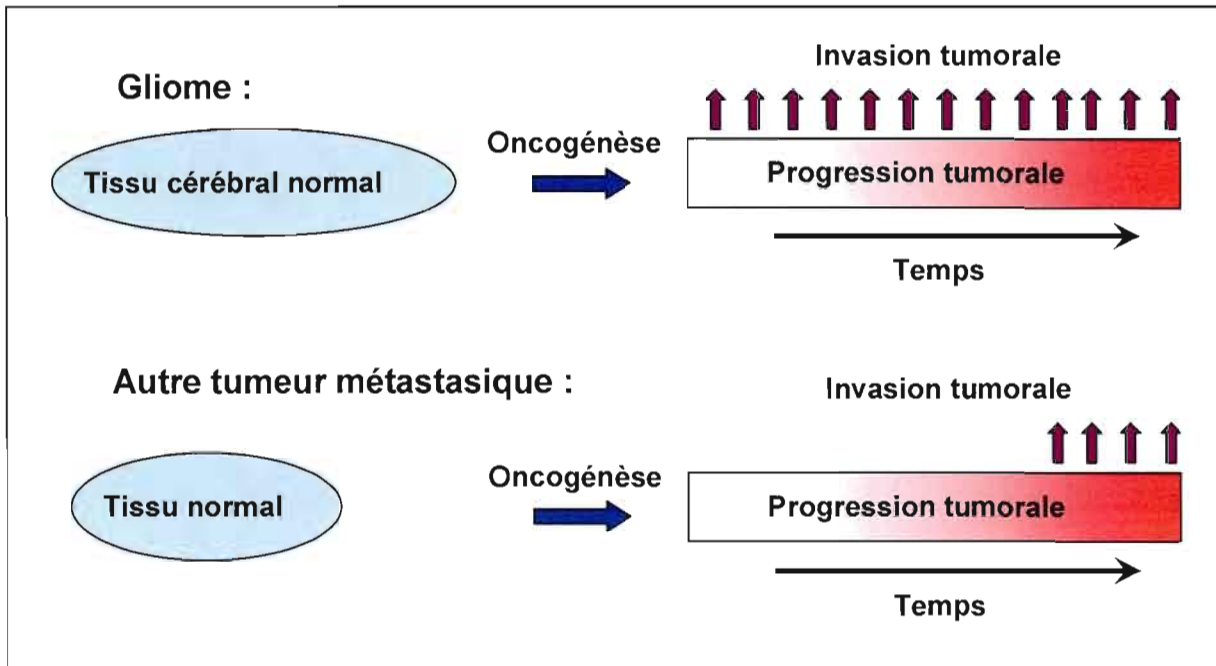


Figure 1.1 : Phénotype infiltrant des gliomes.

Le début du processus oncogénique des gliomes est caractérisé par un phénotype extrêmement invasif. Habituellement, ce phénomène n'est observé que dans les derniers stades de la progression des tumeurs métastatiques.

Adaptée de Mikkelsen *et al.*, 1998

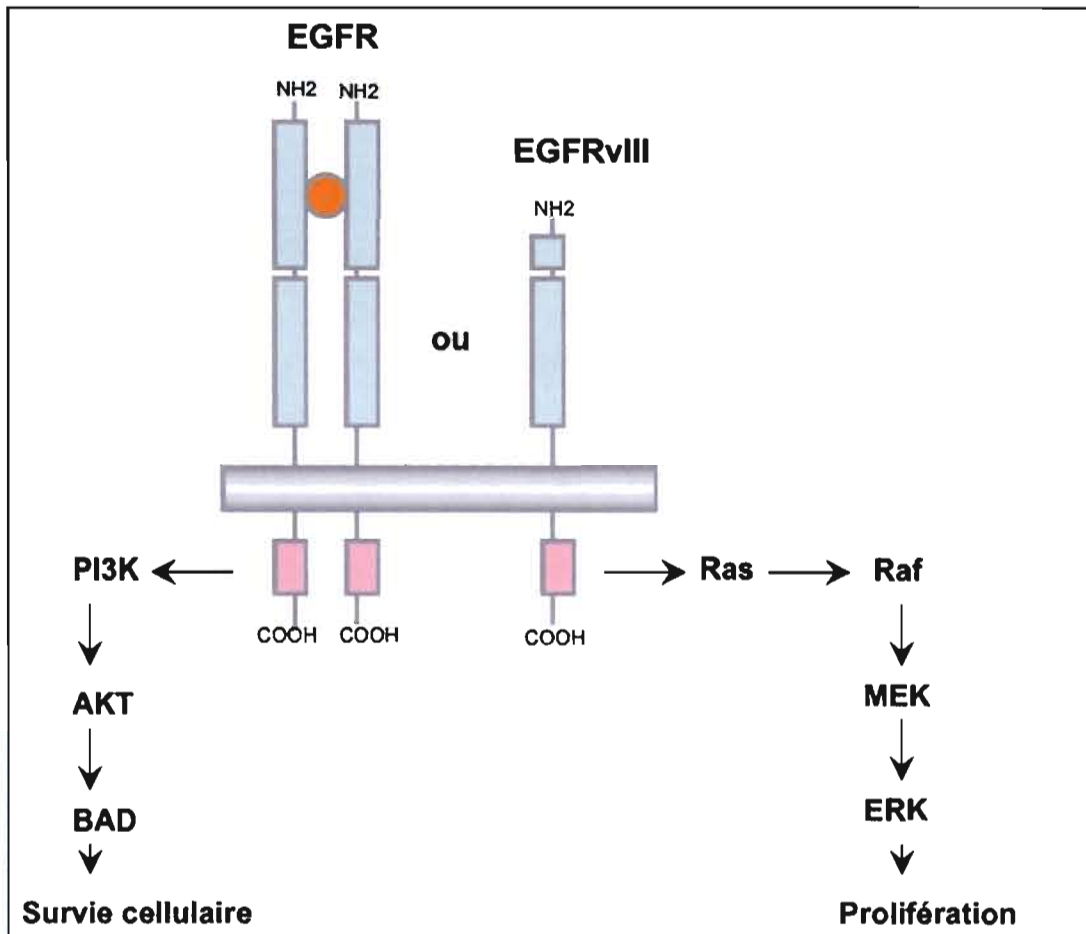


Figure 1.2 : Signaux de transduction cellulaire activés par le récepteur à l'EGF dimérique ou EGFRvIII.

La voie de signalisation (PI3K/AKT) anti-apoptique et celle des MAPK sont activées suite à la dimérisation du EGFR ou suite à l'expression au niveau membranaire du mutant EGFRvIII constitutivement actif.

Adaptée de Pedersen *et al.*, 2001

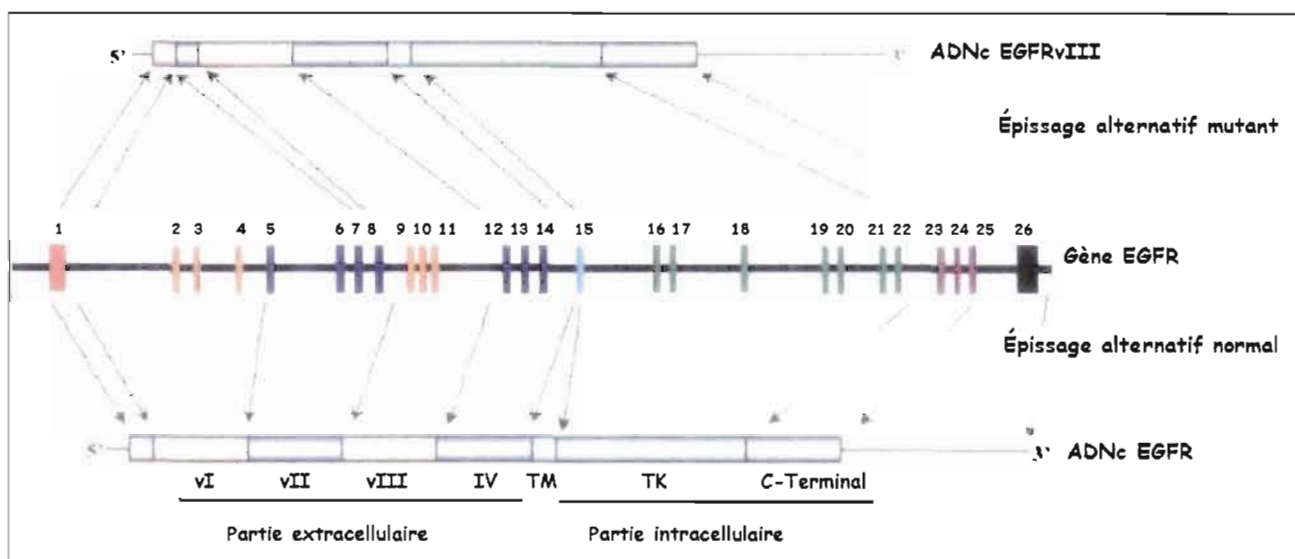


Figure 1.3 : Représentation schématique du gène codant pour le récepteur à l'EGF.

L'épissage alternatif défaillant est responsable du réarrangement générant la variante vIII du récepteur à l'EGF. La boîte orange correspond à l'exon codant pour le peptide signal du récepteur protéique, les exons verts codent pour le domaine catalytique, la portion trans-membranaire est codée par l'exon bleu turquoise et la portion C-terminale par les exons mauves.

Adaptée de Pedersen *et al.*, 2001

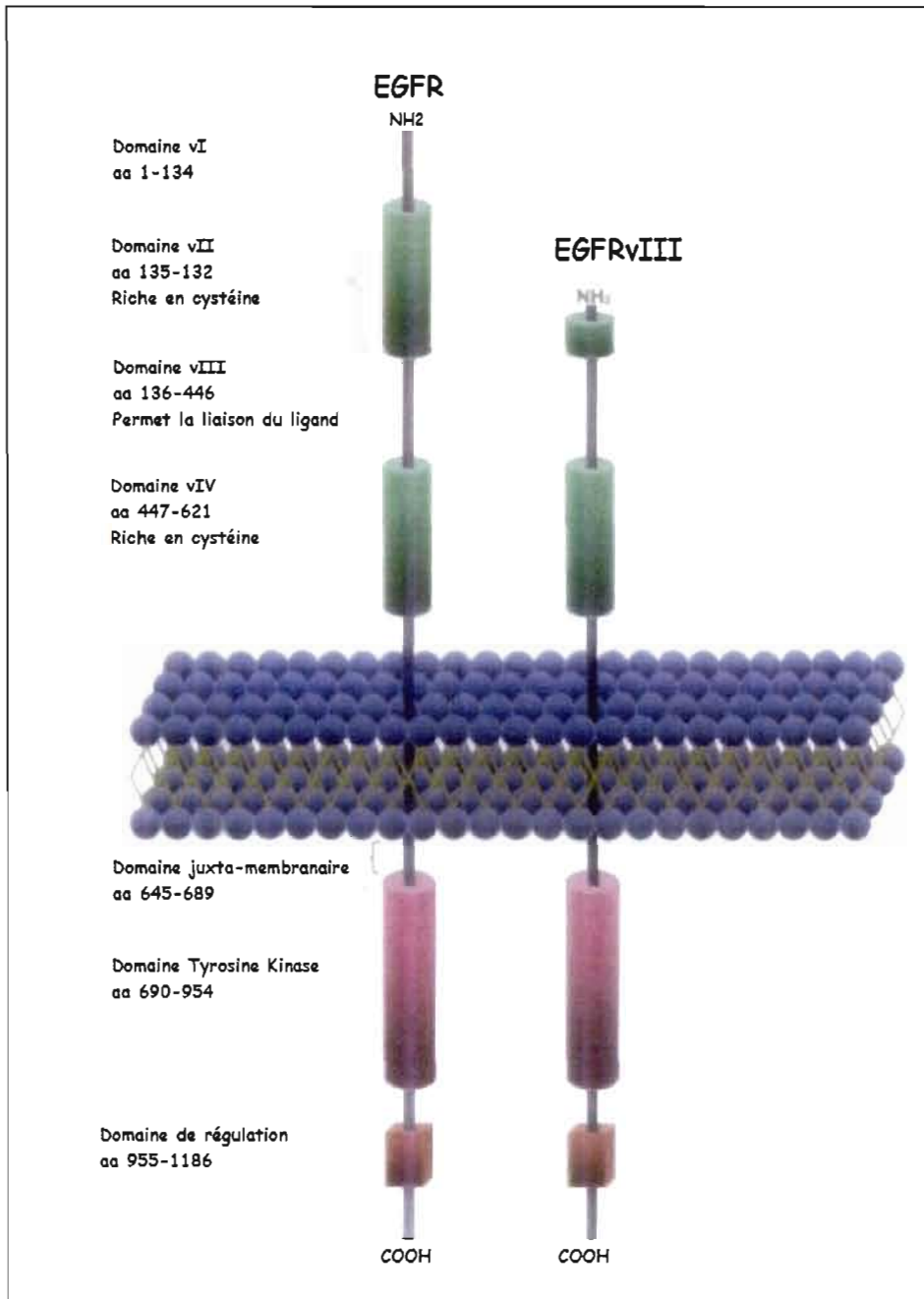


Figure 1.4 : Représentation linéaire du récepteur à l'EGF et de la forme mutée EGFRvIII.

La portion extracellulaire est composée des domaines vI-vIV. Les domaines vII et vIV riches en cystéines forment des ponts disulfures et confère par conséquent au récepteur protéique sa structure secondaire. Les domaines vI et vIII sont quant à eux impliqués dans la liaison des ligands. La portion intracellulaire est composée du domaine juxta-membranaire, du domaine catalytique à activité tyrosine kinase et de la région C-terminale responsable de la régulation du récepteur.

Adaptée de Pedersen *et al.*, 2001

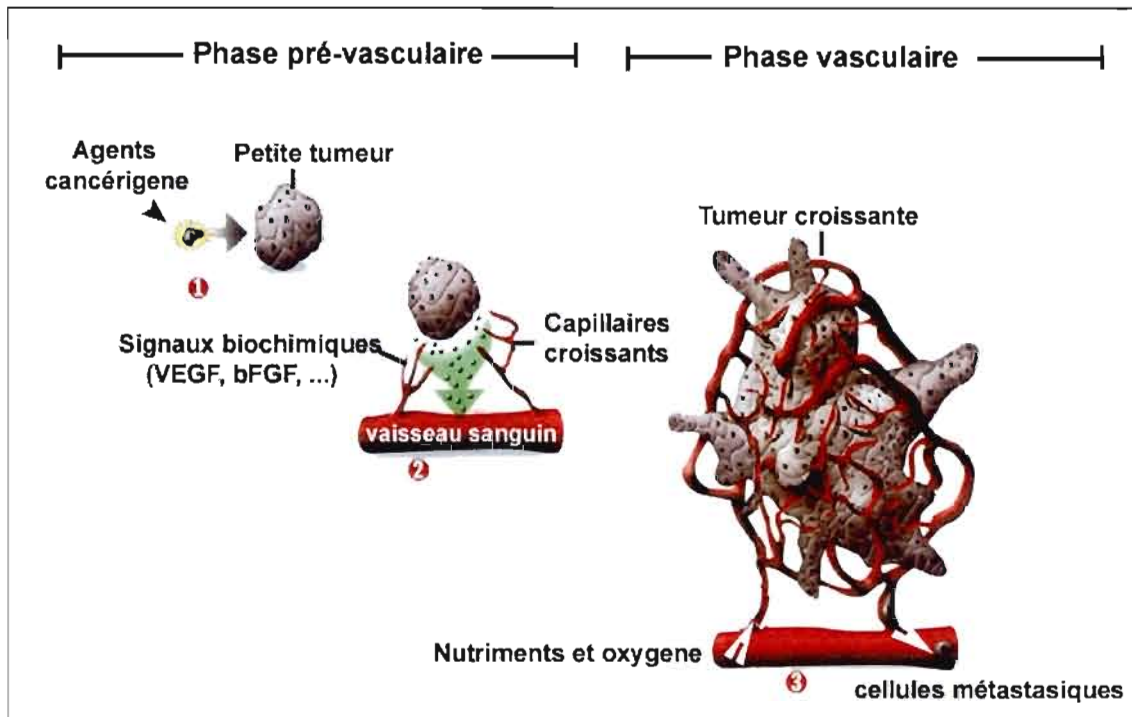


Figure 1.5 : Étapes du processus d'angiogénèse tumorale.

(1) Durant la phase pré-vasculaire, une tumeur atteint une taille limitante de 1mm^3 . (2) À ce stade, le centre de la tumeur en cours de croissance est soumis à une hypoxie qui s'accompagne de phénomènes de nécrose. En réponse à des conditions d'hypoxie, des molécules pro-angiogéniques sont sécrétées par la masse tumorale et induisent la sécrétion de différents facteurs de croissance, dont le principal est le VEGF. Ces molécules de signalisation, responsables du recrutement des cellules endothéliales (CE), stimulent entre autres la production de protéases par les CE, permettant ainsi la dégradation de la membrane basale entourant le vaisseau. (3) C'est alors que la migration des CE vers le foyer tumoral s'effectue et que la formation d'un réseau capillaire entourant la tumeur est observée. Cette vascularisation favorise une croissance tumorale en assurant un approvisionnement en oxygène et en nutriment et permet au cancer d'être disséminé à travers l'organisme via la circulation sanguine.

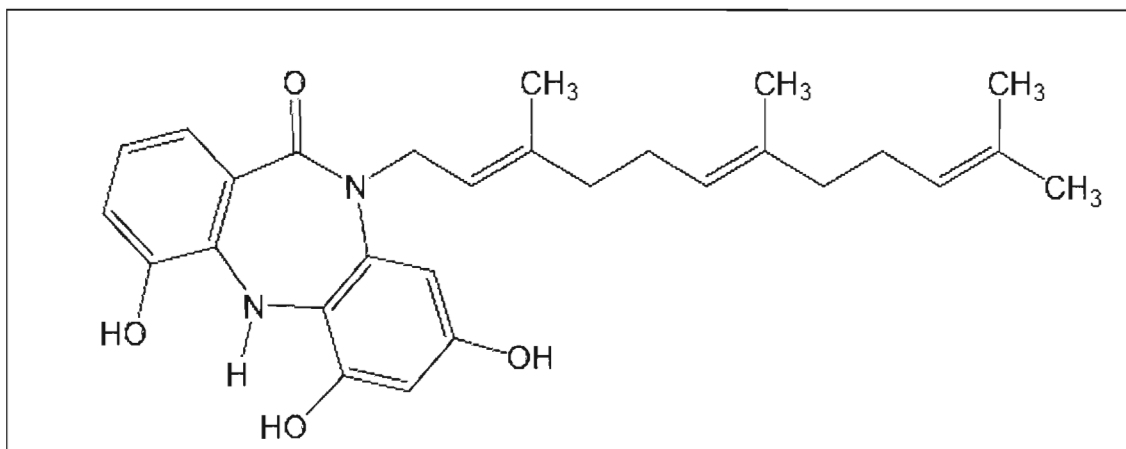


Figure 1.6 : Structure moléculaire du TLN-4601.

TLN-4601 est un composé farnesyle dibenzodiazépinone de faible masse moléculaire (P.M. 462).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Le TLN-4601, sous forme lyophilisée, a été fourni par les laboratoires de Thallion Pharmaceutiques (Montréal, Qc, Canada). Les cellules HBMEC utilisées dans le cadre de cette étude ont été caractérisés et généreusement offertes par le Dr. Kwang Sik Kim de l'école de médecine de l'Université de John Hopkins (Baltimore, MD). Les cellules U87 MG, U87 EGFRwt, U87 EGFRvIII ont gracieusement été données par le Dr. Frank Furnari de l'école de médecine de l'université de Californie à San Diego. La migration cellulaire est effectuée sur des inserts -8 μ m provenant de Costar (Corning, NY). Le Matrigel utilisé pour les essais de tubulogénèse provient de BD Bioscience (Missauga, ON). La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide du réactif MTT provenant de Sigma-Aldrich (Canada). Les anticorps dirigés contre pERK (#4695), ERK (#9106), pRaf-1 (#9427), Raf-1 (#9422), pAKT (#9271), AKT (#9272), pBad (ser112) (#9296), pBad (ser 136) (#5286), MEK (#9122) et PARP (#9542) sont de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Les anticorps contre pMEK (#sc-101733), pEGFR (#sc-12351), EGFR (#sc-03), BAD (#sc-8044) et GAPDH (#sc-47724) viennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les produits d'électrophorèse (acrylamide, TEMED, APS, SDS) proviennent de Bio-Rad (Mississauga, ON). Les échantillons protéiques sont dosés par micro-BCA (Pierce, Rockfort, IL). L'extraction de l'ARN total est réalisée à l'aide de TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON). Les réactions de RT-PCR sont réalisées à l'aide de l'ensemble SuperScript One-Step RT-PCR avec la *Taq* Platinum® de Invitrogen (cat. #10928-042) (Burlington, ON). La synthèse d'ADNc à partir de l'ARN total est effectuée à l'aide d'Oligo dT fournis dans l'ensemble iScript cDNA synthesis reverse transcriptase (Applied Biosystems, cat. #4368813, Beverly, MA) tandis que la PCR en temps réel est effectuée à l'aide de SYBGREEN (Bio-Rad, cat. #170-8882, Mississauga, ON). Les autres réactifs proviennent de chez Sigma-Aldrich (Canada).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

Les U87 MG sont cultivées à 37°C sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et 95 % d'air dans un milieu de culture DMEM (Gibco, Burlington, ON) contenant 10% (v/v) sérum fœtal bovin (SFB) (HyClone Laboratories, Logan, UT) et 1 mM de sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, Canada). Les U87 EGFRwt et les U87 EGFRvIII sont cultivées dans les mêmes conditions toutefois de la généticine (G418) (Sigma-Aldrich, Canada) est ajoutée dans le milieu de culture à raison de 400 µg/ml. Les HBMEC sont cultivées à 37°C sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et 95 % d'air dans le milieu RPMI 1640 (Gibco, Burlington, ON) contenant 10% (v/v) sérum fœtal bovin inactivé (SFBi) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 10 % (v/v) NuSérum (BD Bioscience, Mountain View, CA), vitamines MEM 1% (v/v) (Gibco, Burlington, ON), acides aminés non essentiels MEM 1% (v/v) (Gibco, Burlington, ON), sodium pyruvate 1mM (Sigma-Aldrich, Canada) et un supplément de croissance de cellules endothéliales à 30 µg/ml (Milipore, Temecula, CA). Les HBMEC sont utilisées du passage 3 au passage 25.

2.2.2 Viabilité cellulaire

L'effet anti-prolifératif du TLN-4601 est étudié en utilisant le test MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure]. Ce test est basé sur la capacité de la déshydrogénase mitochondriale des cellules saines actives à cliver l'anneau tétrazolium du produit jaune pâle libérant ainsi un crystal bleu foncé de formazan imperméable aux membranes cellulaires. Le formazan, qui absorbe fortement à longueur d'onde de 550 nm, s'accumule dans les cellules saines. Par conséquent, le nombre de cellules viables est directement proportionnel au niveau de formazan produit. Une analyse colorimétrique simple à l'aide d'un spectrophotomètre permet donc de déterminer la toxicité du produit. Au cours de cette étude, les cellules sontensemencées dans une plaque de 96 puits. Le jour suivant, différentes concentrations de TLN-4601 sont ajoutées dans un milieu de culture. Après 72 h, 20 µl de la solution de MTT à 5 mg/ml sont ajoutées dans chaque puit pour obtenir une concentration finale de 0,5 mg/ml. Les cellules sont alors incubées pendant 4 heures à 37°C. Après cette période, le milieu est aspiré et 200 µl de DMSO sont ajoutés. Finalement, les cellules sont incubées 5 minutes à 37°C et une lecture est effectuée à l'aide d'un lecteur de plaques à une longueur d'onde de 550 nm.

2.2.3 *Lyse cellulaire*

Les cellules sont cultivées dans des plaques de six puits jusqu'à atteindre 85% de confluence, puis traitées avec différentes concentrations de TLN-4601. Après le traitement, les cellules sont décollées à l'aide d'un policeman puis centrifugées pendant 5 minutes à 5, 000 rpm. Elles sont ensuite lavées à l'aide d'une solution de PBS froid (pH 7.4) et centrifugées à 5, 000 rpm durant 5 minutes. Le culot cellulaire obtenu est lysé durant 30 minutes sur glace dans une solution contenant Tris-Hcl 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, NP-40 0,5%, EDTA 1mM, Vanadate de sodium 0,2 mM, PMSF 0,2 mM. Les débris cellulaires sont enlevés par une centrifugation à 10, 000 rpm de 30 minutes à 4°C.).

2.2.4 *Dosage des protéines selon la méthode de microBCA*

Le contenu protéique des lysats cellulaires est quantifié par microBCA selon les directives du fabricant (Pierce). Plus précisément, la quantité de protéines a été dosée selon la méthode de MicroBCA en utilisant différentes concentrations d'albumine sérique bovine (BSA) pour tracer la courbe standard. 150 µl de chaque échantillon et des solutions standards ont été ajoutés à 150 µl du réactif de MicroBCA dans une plaque de 96 puits. Par la suite, la plaque a été incubée à 37°C pendant 2 heures. Finalement, le produit de réaction pourpre formé par une liaison de coordination a été mesuré à une longueur d'onde de 562 nm.

2.2.5 *Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)*

Une quantité égale de protéines pour chaque échantillon est ensuite remise en suspension dans un tampon réducteur contenant 62,5 mM Tris-Hcl (pH 6.8), 10% glycérol, 2% SDS, 5% β-mercapto-éthanol et 0,00625% bromophénol. Les échantillons sont bouillis à 95°C pendant 5 minutes avant d'être soumis à l'électrophorèse. Les gels d'entassement sont composés de 3,8% de polyacrylamide/bisacrylamide dissout dans une solution tampon 0,125 M de Tris-Hcl (pH 6.8), 0,1% SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS tandis que le pourcentage de polyacrylamide/bisacrylamide varie pour les gels de séparation en fonction de la protéine d'intérêt. De plus, le tampon de séparation est composé de 0,375 M Tris-Hcl (pH 8.8), 0,1% SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. Les protéines des échantillons sont séparées selon leur poids moléculaire par SDS-PAGE. Après la migration, les protéines sont transférées sur une

membrane de (PVDF) qui est bloquée une heure à température pièce dans une solution blotto composée de 150 mM Tris, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,3% TBST et 5% lait en poudre, dans le but de minimiser les liaisons non spécifiques.

2.2.6 *Immunodétection des protéines*

Les membranes subissent par la suite trois lavages successifs de 15 minutes dans du TBST 0,3% et sont incubées avec une dilution de l'anticorps primaire dans le TBST 0,3% contenant 3% de BSA toute la nuit à 4°C. Ensuite, une autre série de lavages est réalisée avant que les membranes soient incubées avec l'anticorps secondaire respectif conjugué avec des peroxydases (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA) dilué à 1/2500 dans du TBST contenant 5% lait en poudre durant une heure à température pièce. La détection des protéines d'intérêts est réalisée à l'aide d'une solution de ECL (Amersham, Biosciences, Baie d'Urfée, QC) sur un film d'autoradiographie.

2.2.7 *Extraction de l'ARN total*

Les cellules sont cultivées dans des plaques de culture de six puits jusqu'à atteindre 85% de confluence et sont traitées avec différentes concentrations de TLN-4601 dans un milieu de culture. L'ARN total des cellules est isolé en utilisant 1 ml de TRIzol, conformément aux instructions du manufacturier (Invitrogen). Plus précisément, 200 µl de chloroforme sont ajoutés au TRIzol. Le mélange est ensuite maintenu à température pièce durant 3 minutes après une agitation vigoureuse de 15 secondes. Par la suite, le tout est centrifugé à une vitesse de 11, 750 g à 4°C. Puis, la phase supérieure est récupérée et 500 µl d'isopropanol sont ajoutés. Après une période d'incubation de 10 minutes à température pièce, le mélange est centrifugé à 11, 750 g pour 10 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite enlevé et remplacé par 1 ml d'éthanol 75% dans le but de laver le culot d'ARN et le tout est centrifugé une dernière fois durant 5 minutes à 6 610 g à 4°C. L'ARN obtenu est dissout dans 20 µl d'eau RNase free et quantifié par absorbance à une longueur d'onde de 280 nm. Finalement, les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2.8 RT-PCR semi-quantitative

Environ 1 µg d'ARN total est extrait des cellules et amplifié avec le Superscript™ One-Step-RT-PCR with Platinum® Taq, en utilisant des amorces spécifiques construites pour les ADNc humains EGFR, PBR et GAPDH. Le tableau III représente la séquence des amorces utilisées pour l'amplification spécifique de l'ADN. La réaction enzymatique a débuté par la transcription inverse de l'ARN en ADNc. Ensuite, 20 cycles sont réalisés pour amplifier l'ADNc du gène EGFR humain selon la programmation suivante : 30 secondes à 92°C; 60 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C tandis que 35 cycles sont effectués pour amplifier l'ADNc du gène PBR humain selon la programmation suivante : 30 secondes à 92°C; 60 secondes à 65°C et 30 secondes à 72°C. Finalement, l'extension finale est réalisée à une température de 72°C durant 10 minutes.

Le gène GAPDH est utilisé comme étalon interne. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5 % (p/v). Les gels d'agarose sont coulés dans un tampon Tris-Acétate (TAE) contenant du bromure d'éthidium. Les amplicons sont visualisés sous une lumière d'ultra-violets (UV).

2.2.9 PCR en temps réel

Un µg d'ARN est utilisé pour la synthèse d'ADNc par transcription inverse (RT) à l'aide du kit Taq PCR Master Mix (Site de QIAGEN) dans un volume réactionnel de 25 µL. La réaction de RT est réalisée selon le programme suivant : 25 °C pendant 10 minutes; 37°C pendant 120 minutes et 85°C pendant 5 secondes. Ensuite, l'ADNc est utilisé pour réaliser la PCR quantitative. Au début de la PCR, les brins complémentaires sont dénaturés en chauffant les échantillons à 95°C pendant 3 minutes. L'amplification des ADNc d'intérêts s'est déroulée pendant 40 cycles. Chacun des cycles comprenait un chauffage à 95°C pendant 15 secondes afin de séparer les brins, puis la température s'abaissait à 60°C pendant 1 minute pour permettre l'appariement des amorces sur le brin matrice, finalement la température s'élevait à 72°C durant 30 secondes afin de permettre l'élongation du brin complémentaire par la Taq Polymérase. L'amplification des ADNc est mesurée par fluorescence en utilisant un Icyler (Bio-Rad, Hercules, CA). Cet appareil détecte la fluorescence générée par le SYB Green (Bio-Rad, Hercules, CA) qui

s'intercale dans l'ADN double brin formé lors de la réaction de PCR. La quantité relative de l'ARNm du gène cible par rapport au contrôle interne, l'ARNm 18S ribosomal, est calculée par la méthode (ΔC_T). Au cours de la réaction enzymatique, le logiciel d'exploitation des données IQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA) affiche un graphique du signal de fluorescence versus le nombre de cycles au cours de la PCR en temps réel. Finalement, les différences entre les valeurs moyennes en duplicatas et ceux du contrôle interne (ΔC_T) sont également calculées et exprimées en unité relative par le logiciel.

2.2.10 Dosage de la caspase-3

L'activité de la caspase-3 de lysats cellulaires est quantifiée par fluorescence. Premièrement, les cellules sont récoltées et culottées par une centrifugation à 4, 000 g de 5 minutes. Après un lavage au tampon phosphate salin froid (PBS), les cellules sont lysées dans une solution tampon contenant 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM PPI en vortexant vigoureusement à chaque 3 minutes pendant 30 minutes. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 13, 000 g, pendant 20 minutes à 4 °C afin de se débarrasser des débris cellulaires non solubles. L'activité enzymatique de la caspase-3 du surnageant est mesurée dans une solution tampon contenant 50 mM Hepes/NaOH (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 10% sucrose et 5 mM DTT. Les échantillons sont préalablement incubée 2 minutes à 37°C avant que la réaction enzymatique soit initiée en ajoutant le substrat fluorogénique acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorométhylcoumarin (Ac-DEVD-AFC) à raison de 50 μM . Les lectures au fluorimètre sont programmées à chaque minute pendant 30 minutes à une longueur d'onde d'excitation 400 nm et d'émission de 505 nm qui correspond au spectre de fluorescence de l'AFC libéré. Les valeurs de vitesses maximales, réalisées en triplicatas, ont été corrigées en fonction de la quantité de protéines et exprimées en unité relative de fluorescence (rfu)/s/ μg de protéine.

2.2.11 Essai de migration cellulaire

La migration des U87 et des HBMEC est effectuée sur des inserts de 6,5 mm de diamètre, lesquels sont également appelés chambre de Boyden. Ils sont munis d'un filtre comportant des pores de 8 μm et sont disposés sur une plaque de 24 puits. Tout d'abord, les chambres sont préalablement revêtues de gélatine (0,15%) (p/v) pour les U87 ou de collagène (0,2%) (p/v) pour les HBMEC durant une heure à 37 °C. Durant cette période d'incubation, les cellules à

confluence sont trypsinisées et resuspendues dans du milieu de culture DMEM ou RPMI selon la lignée à l'étude afin d'obtenir une concentration de 10^6 cellules/ml. Par la suite, 500 μ l du milieu de culture contenant différentes concentrations de TLN-4601 sont déposés dans la partie inférieure des puits. Puis, 100 μ l des suspensions cellulaires sont déposés sur la partie supérieure de l'insert et la migration a été initiée à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. À la fin de cette période d'incubation, la migration est arrêtée après 6 heures et les cellules sont fixées à l'aide d'une solution 10% formalin phosphate, puis colorées au crystal violet (0,1%) dans 20% méthanol durant une heure. Finalement, les cellules ayant migrées sur la portion inférieure des filtres sont comptabilisées par analyse microscopique à un agrandissement 10 X à l'aide du logiciel Northern Eclipse. Ces valeurs correspondent en fait à la moyenne des cellules présentes dans quatre champs représentatifs pour chaque condition obtenus à un grossissement de 10X.

2.2.12 Essai de tubulogénèse sur matrigel

Des aliquots de 50 μ L de Matrigel sont déposés dans chaque compartiment d'une plaque de 96 puits. Ensuite, la plaque est incubée à 37°C pendant au moins 30 minutes afin de permettre la réaction de polymérisation du produit. Durant cette période d'attente, des cellules HBMEC ayant atteint la confluence, préalablement traitées et non traitées au TLN-4601, sont trypsinisées et resuspendues dans du milieu RPMI afin d'obtenir une suspension cellulaire d'une concentration finale de 10^6 cellules/mL. 100 μ l de cette suspension sont ensuite déposés sur Matrigel. Après une heure, les cellules sont mises ou non en contact avec le médicament durant la formation de capillaires. Après 72 heures, des photographies sont prises par microscopie à contraste de phase à un agrandissement 10 X dans le but de visualiser l'effet du médicament sur la tubulogénèse. L'analyse des structures de type capillaire a finalement été effectuée à l'aide du logiciel Northern Eclipse.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Activité biologique du TLN-4601 sur les glioblastomes.

3.1.1 Validation des modèles cellulaires

La lignée de glioblastomes humains U87 MG a été modifiée génétiquement pour surexprimer le récepteur à l'EGF de type sauvage ou surexprimer le mutant tronqué EGFRvIII simulant ainsi les GBM agressifs. Les cellules astrocytaires recombinantes surexprimant le gène oncogénique EGFR ont été validées par RT-PCR semi-quantitative (figure 3.1 A). Comme l'électrophorèse sur gel d'agarose permet de le constater, les produits d'amplification du gène EGFR et GAPDH, générés à partir des amorces présentées au tableau III, possèdent la grandeur attendue qui est respectivement de 98 et 540 paires de bases. D'une part, le niveau d'expression du transcrit primaire du récepteur à l'EGF est fortement amplifié chez les deux lignées recombinantes comparativement aux cellules U87 MG dont le taux d'expression s'avère trop faible pour être détecté. Ces résultats valident la surexpression du gène d'intérêt chez les glioblastomes recombinants sans toutefois pouvoir discriminer l'amplification du gène EGFR de type sauvage, de celle de la forme mutée EGFRvIII. Cette nuance n'a pu être établie par PCR dû à un manque de spécificité des amorces utilisées. D'autre part, l'amplification équivalente du gène d'intérêt chez les cellules recombinantes suggère que l'efficacité de transfection est semblable entre les U87 EGFRwt et U87 EGFRvIII. Cependant, il faut garder en tête que cette méthode est dite semi-quantitative et ne permet aucunement de mesurer l'efficacité de transfection entre les modèles cellulaires. Une caractérisation plus approfondie des lignées astrocytaires sera donc nécessaire pour valider les modèles proposés.

Afin d'évaluer l'efficacité de transfection des lignées cellulaires, une analyse par PCR en temps réel a été réalisée (figure 3.1 B). La PCR en temps réel comparativement aux autres techniques usuelles, est dotée d'une plus grande sensibilité et spécificité. Ce type d'analyse est dit quantitatif et normalise l'expression d'un gène d'intérêt par rapport à celle d'un gène rapporteur, dont l'expression n'est pas modulée par les conditions expérimentales. La PCR en temps réel contrairement à la RT-PCR semi-quantitative quantifie en temps réel les produits d'amplification de la réaction enzymatique, ce qui permet de s'assurer que l'analyse des résultats est effectuée

avant d'atteindre un plateau de saturation. Cette méthode de pointe a permis de valider une fois de plus la surexpression du gène oncogénique EGFR chez les glioblastomes recombinants par rapport à la lignée parentale. Les résultats suggèrent que l'efficacité de transfection et d'expression du gène d'intérêt est environ deux fois plus importante chez la lignée U87 EGFRwt que chez les cellules U87 EGFRvIII. Cependant, ces résultats ne permettent pas de déterminer l'expression protéique du récepteur chez les différents modèles cellulaires, puisque la PCR en temps réel mesure exclusivement les niveaux d'ARN_m d'un gène d'intérêt. En effet, plusieurs modifications post-transcriptionnelles de l'ARN_m peuvent entraver la synthèse protéique. Bien que possible cette éventualité paraît peu probable, puisque les modèles cellulaires ont été auparavant validés par l'équipe du Dr. Frank Furnari. Cependant, elle ne peut être totalement exclue.

Nous avons donc procédé à une analyse du contenu protéique en EGFR dans les glioblastomes par SDS-PAGE en conditions dénaturantes (Figure 3.2). L'expression protéique du récepteur à l'EGF observées sur l'autoradiogramme démontre que la protéine oncogénique est bel et bien amplifiée chez les glioblastomes recombinants comparativement à la lignée parentale. De plus, il est aussi intéressant de remarquer que le EGFR détecté chez les U87 EGFRvIII possède un poids moléculaire inférieur à celui détecté chez les cellules U87 EGFRwt qui est d'environ 170 KDa. Cette variation de 25 KDa correspond en fait à la délétion des exons 2-7 de la portion extracellulaire du récepteur, ce qui confirme que les cellules U87 EGFRvIII expriment une isoforme tronquée du récepteur. La présence du doublet (140-145 KDa) suite à l'immunodétection de EGFRvIII est causé par un phénomène post-traductionnel de glycolysation. En fait, il a été démontré qu'en enlevant les groupements glycosyls de EGFRvIII par digestion enzymatique, une disparition complète du doublet se produit et une apparition d'une simple bande migrant à environ 118 KDa est observée, indiquant ainsi l'hétérogénéité des structures glycaniques du récepteur (Chu *et al.*, 1997). Les analyses de RT-PCR semi-quantitative, de PCR en temps réel et d'immunobuvardage de type western, nous ont permis de valider les modèles de glioblastomes humains.

3.1.2 Effet du TLN-4601 sur la viabilité cellulaire.

L'effet du TLN-4601 sur la viabilité cellulaire a été évalué à l'aide du test MTT après une période de 72 heures d'incubation dans un milieu supplémenté de 10 % de sérum (figure 3.3). Bien qu'une légère baisse de la viabilité cellulaire des glioblastomes ait été remarquée à une concentration de 5 μ M de TLN-4601, cette dernière a été jugée minime compte tenu du fait qu'elle représente de 10% à 15% de la viabilité totale. Une sensibilité différentielle des modèles cellulaires est observée à une concentration de 10 μ M. En effet, les essais de viabilité démontrent que les cellules U87 EGFRwt sont plus sensibles au médicament comparativement aux deux autres lignées cellulaires. D'autre part, les glioblastomes surexprimant la forme mutée du récepteur à l'EGF semblent être plus résistants à l'action du médicament par rapport à la lignée parentale. À la lumière de ces résultats, des concentrations de TLN-4601 comprises entre 0 et 5 μ M ont été utilisées pour étudier le mécanisme d'action du médicament. Le test de MTT nous indique que dans ces conditions expérimentales, l'effet du TLN-4601 sur la signalisation cellulaire des glioblastomes n'est pas attribuable à une cytotoxicité non spécifique. Dans un deuxième temps, des concentrations plus élevées ont été utilisées pour caractériser l'action du médicament sur la survie cellulaire (figure 3.8). Les résultats du test MTT démontrent que la survie des glioblastomes commence à diminuer considérablement suite à un traitement de 10 μ M. L'effet du TLN-4601 à cette concentration n'est toutefois pas corrélé à une cytotoxicité non spécifique, puisque l'expression protéique du contrôle interne AKT reste constante selon les analyses d'immunobuvardage de type western (figure 3.8A). L'action du TLN-4601 sur la mort des glioblastomes via un processus apoptique a également été étudiée en testant le médicament à des doses plus importantes, mais durant des temps plus courts. L'expression protéique du contrôle interne GAPDH reste également invariable dans ces conditions expérimentales (figure 3.7B). Il existe des moyens plus fidèles que le test du MTT pour mesurer la viabilité. Plusieurs auteurs critiquent l'utilisation de ce test en raison de son caractère indirect, puisqu'il ne mesure pas la mort cellulaire, mais plutôt l'activité métabolique. Ce test se base sur le fait que le nombre de cellules diminuera de façon linéaire ou inversement proportionnelle à la dose de drogue utilisée. Hors, cette affirmation n'est pas respectée lorsqu'un médicament affecte de manière non linéaire le nombre de cellules en induisant l'apoptose ou des changements dans le cycle cellulaire. Il aurait été préférable d'effectuer une double marquage au 2'-7'-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein

(BCECF) et à l'iodure de propidium pour mesurer la viabilité cellulaire des glioblastomes suite à un traitement au TLN-4601 (Leeder *et al.*, 1989).

3.1.3 Effet du TLN-4601 sur le phénotype infiltrant des glioblastomes

Le caractère infiltrant accru des tumeurs cérébrales est l'une des caractéristiques majeures des gliomes retrouvées même à un stade précoce de leur développement (Mikkelsen *et al.*, 1998). L'infiltration est un mécanisme complexe mettant en jeu les capacités migratoires propres des cellules tumorales gliales et celles des cellules normales du cerveau (Furnari *et al.*, 2007). C'est également une des causes majeures de l'échec des traitements de cette maladie (Garfield, 1986). Plusieurs études ont démontré que l'activation d'EGFR induit des voies de signalisation impliquées dans la migration cellulaire (Pedersen *et al.*, 2001). L'effet du TLN-4601 sur le caractère infiltrant des glioblastomes recombinants a donc été évalué en absence et en présence de leur ligand (figure 3.4). Les résultats des essais de migration montrent que la surexpression du récepteur à l'EGF de type sauvage ou de la forme mutante augmente de manière significative la migration basale comparativement à la lignée parentale, U87 MG. D'autre part, l'ajout du ligand EGF augmente la migration de la lignée parentale et affecte peu les deux lignées surexprimant EGFR de type sauvage ou de la forme mutante. Ce résultat suggère que la surexpression d'EGFR entraîne son activation. À cet égard, il est bien documenté que le EGFR portant la mutation vIII est activé de façon constitutive. Un traitement au TLN-4601 inhiberait de manière significative la migration cellulaire basale et induite par l'EGF des trois modèles cellulaires, indiquant par le fait même que l'action anti-invasive du médicament serait EGF-indépendante (figure 3.4 B). Il faut cependant noter que le TLN- 4601 ramène la capacité invasive des U87 EGFRvIII à des valeurs inférieures à celles observées dans les conditions basales en absence du médicament (figure 3.4 B), ce qui suggère que le TLN-4601 inhibe également l'invasion tumorale dépendante de l'EGF. Malgré ces valeurs, l'action anti-invasive du médicament devrait néanmoins être indépendante de l'EGF pour les U87 EGFRvIII, puisque le récepteur muté est actif de manière constitutive et par conséquent indépendant de son ligand. Il faudrait refaire ces expériences afin de confirmer ces valeurs expérimentales.

La voie de signalisation RAS-MAPK responsable entre autres de la croissance cellulaire et de l'invasion tumorale a été étudié par immunobuvardage de type western, car plusieurs données précliniques suggèrent que TLN-4601 est un inhibiteur efficace de cette voie. Nous avons étudié l'effet du médicament sur cet axe de signalisation dans le but de mieux comprendre

les mécanismes moléculaires associés à l'activité anti-migratoire du médicament. En fait, la littérature rapporte plusieurs inhibiteurs RAS-MAPK possédant des propriétés anti-invasives (Joy *et al.*, 2003). En explorant en détail cet axe de signalisation, il a également été possible de vérifier l'effet inhibiteur du TLN-4601 sur les MAPK de glioblastomes humains, ce qui n'avait pas encore été confirmé jusqu'à ce jour. Les résultats de la figure 3.5A montrent que le EGFR n'est pas phosphorylé dans les conditions basales des cellules U87 MG comparativement aux cellules transfectées avec le récepteur sauvage et muté. De plus, le traitement à l'EGF stimule tel qu'attendu la phosphorylation du récepteur et l'intensité de ce signal n'est pas affectée de manière significative par TLN-4601, suggérant ainsi que l'action de la molécule anti-cancéreuse est EGF-indépendante. Suite à l'induction de la voie RAS-MAPK par l'EGF, un phénomène de rétro-inhibition de l'expression du récepteur est observé uniquement chez les lignées cellulaires U87 MG et U87 EGFRwt. Ce résultat s'explique par le fait que contrairement à EGFR, la variante EGFRvIII constitutivement active, est inefficacement internalisée et dégradée dû à un adressage vésiculaire aux lysosomes altéré (Pederson *et al.*, 2001; Grandal *et al.*, 2007). Il est à noter qu'un traitement au TLN-4601 diminue la quantité de récepteur à l'EGF, et ce, pour les trois lignées de cellules astrocytaires. L'analyse densitométrique de la figure 3.5B indique que TLN-4601 en présence d'EGF stimule faiblement la phosphorylation d'EGFR, tout en inhibant de manière efficace l'expression protéique de c-Raf, pMEK et pERK. L'inhibition des kinases Raf-1 et ERK oncogéniques est plus faible chez les U87 EGFRvIII, mimant les GBM plus agressifs, suggérant ainsi une résistance de cette lignée aux effets de la molécule. L'inhibition de la forme active de ERK pourrait partiellement expliquer l'action moléculaire anti-invasive du TLN-4601. En fait, plusieurs ouvrages font état de l'induction de l'invasion et la migration cellulaire via la kinase ERK qui influence soit les niveaux transcriptionnels de molécules pro-migratoires ou l'activation directe d'enzymes nécessaires à la locomotion des cellules (Hood et Cheresch, 2002). L'effet du TLN-4601 sur la transcription des gènes EGF et Raf-1 de même que la stabilité de ces protéines sont des sujets qui restent encore à être étudiés.

De récentes études ont aussi démontré que la sérine/thréonine kinase AKT, généralement reconnue pour son rôle dans la survie cellulaire, la régulation de la croissance cellulaire et la synthèse protéique, serait également impliquée dans des mécanismes migratoires chez les glioblastomes (Joy *et al.*, 2003; Chandrasekar *et al.*, 2003). Ces résultats sont en accord avec le fait que les mutations dans PTEN sont associées à un phénotype plus infiltrant (Ducray, 2008). En se basant sur ces informations, nous avons étudié l'effet du TLN-4601 sur la voie de signalisation de la PI3K/AKT chez les glioblastomes. Le facteur de croissance utilisé pour étudier

l'action du TLN-4601 sur l'axe PI3K/AKT est l'IGF, car des données préliminaires ont démontrées que ce facteur de croissance induit plus efficacement cette voie de signalisation que l'EGF (ces résultats n'ont pas été présentés dans cet ouvrage). La figure 3.6A montre que suite à un traitement à l'IGF plusieurs joueurs clef de la voie des MAPK tels que Raf-1, pMEK et pERK sont induits, cependant aucune activation de AKT n'est observée. L'analyse densitométrique des protéines de l'immunotransfert (figure 3.6B) documente l'effet inhibiteur du médicament après l'induction à l'IGF sur l'expression protéique de pRaf-1 et pMEK pour les trois lignées cellulaires à l'étude. La régulation à la baisse des niveaux de phosphorylation des protéines AKT et ERK quant à elle est observée que chez les U87 MG et les U87 EGFRwt. Ces informations indiquent une fois de plus que les glioblastomes mutants U87 EGFRvIII sont moins sensibles à l'activité anticancéreuse de la molécule. L'inhibition des taux de phosphorylation de AKT chez les U87 MG et les U87 EGFRwt contribue à l'effet anti-invasif du TLN-4601, toutefois cette modulation peut également affecter d'autres processus biologiques impliquant l'activité enzymatique de cette kinase appartenant à une voie de signalisation cellulaire majeure.

3.1.4 *Effet du TLN-4601 sur la mort cellulaire des glioblastomes.*

En condition physiologique, les cellules tumorales sont habituellement éliminées par l'organisme en induisant l'apoptose, mais certaines d'entre elles sont capables d'échapper à ce mécanisme en accumulant des anomalies génétiques (Ohgaki, 2007). Chez les glioblastomes, la délétion de PTEN a pour effet d'amplifier la voie de la PI3K/AKT permettant ainsi aux cellules d'acquérir une protection accrue vis-à-vis l'apoptose (Maehama et Dixon, 1999). Il est bien connu que la mort cellulaire via un mécanisme apoptotique induit l'activation de certaines protéases appelées les caspases. Ces enzymes effectrices jouent un rôle primordial en clivant PARP, un substrat protéique dont la fonction est de recruter des enzymes participant à la réparation de l'ADN (Ray *et al.*, 2002). Dans le but de vérifier l'effet du TLN-4601 sur la mort cellulaire, l'activité de la caspase-3 a été mesurée à l'aide d'essais enzymatiques (figure 3.7A). Les U87 parentales sont beaucoup plus sensibles à l'activité anti-cancéreuse du composé que les lignées recombinantes. Toutefois, une activation de la caspase-3 est quand même détectée chez les cellules transfectées avec les récepteurs sauvages et mutés, ce qui suggère que le médicament est aussi bien cytotoxique pour ces lignées astrocytaires que pour les lignées sauvages. De plus, le TLN-4601 induit le clivage de PARP (figure 3.7 B), un marqueur de l'apoptose, dans les trois lignées cellulaires, bien que des doses plus élevées et des temps de traitement plus longs soient nécessaires pour entraîner un clivage de PARP chez les lignées recombinantes. Conformément

aux résultats précédents, l'immunodétection de la caspase 9 démontre que le clivage du domaine pro de l'enzyme est beaucoup plus important chez les U87 MG que chez les deux autres lignées cellulaires. Ces résultats suggéreraient un effet différentiel du TLN-4601 sur les modèles cellulaires à l'étude. En effet, il semblerait que les U87 EGFRvIII plus agressives soient moins sensibles à l'effet cytotoxique du médicament contrairement aux U87 MG qui le sont plus. D'autre part, la détection de PARP clivé à des doses plus faibles que celles nécessaires pour visualiser la forme active de la caspase 9 semble être un résultat incohérent. Toutefois, il s'explique par le fait que les anticorps primaires spécifiques à PARP décèlent des quantités plus faibles de la protéine d'intérêt comparativement aux anticorps de la caspase 9. Il serait donc intéressant de détecter spécifiquement la forme active de la caspase 9 par une autre méthode plus sensible en ayant recours par exemple à des essais enzymatiques ou des essais par cytométrie de flux.

Nous avons décidé d'étudier l'effet du TLN-4601 sur BAD (figure 3.8A), compte tenu du fait que le médicament induit l'apoptose chez les lignées astrocytaires et qu'il diminue l'activité de la kinase AKT (Stambolic *et al.*, 1998; Hlobikova *et al.*, 2000; Berrie, 2001; Joy *et al.*, 2003). Dans la littérature, il est bien établi que AKT phosphoryle BAD à la position sérine 136 ce qui induit en partie un effet anti-apoptotique en empêchant son hétérodimérisation avec Bcl-X_L. Toutefois, la phosphorylation de la serine 112 de BAD par la kinase MEK doit aussi être présente pour court-circuiter l'entrée en apoptose des cellules tumorales (Fang *et al.*, 1999). Les résultats indiquent que les deux sites de phosphorylation de BAD sont inhibés avec des concentrations croissantes de TLN-4601 chez les U87 MG. L'effet du médicament sur les sites de la phosphorylation de BAD chez les deux autres lignées cellulaires à l'étude est plutôt visible à des doses plus fortes de 5 μ M pour les U87 EGFRwt et 10 μ M pour les U87 EGFRvIII (figure 3.8 A et B). L'inhibition de pBad (ser112) pourrait être attribuée à la régulation à la baisse des MAPK tandis que la phosphorylation de pBad (ser136) est plutôt imputée à l'inhibition de pAKT. La mort cellulaire des trois lignées astrocytaires via un processus apoptotique est également confirmée par le clivage dose-dépendant de PARP (figure 3.8 A et C). Donc, l'action cytotoxique du médicament est plus efficace chez U87 MG que chez les lignées recombinantes tandis que les U87 EGFRvIII sont les plus résistantes à la mort cellulaire par apoptose.

3.2 Activité biologique du TLN-4601 sur l'environnement tumoral des glioblastomes.

3.2.1 *Effet du TLN-4601 sur le recrutement des cellules endothéliales au foyer tumoral.*

Différents travaux ont montré que la néovascularisation des gliomes par les cellules endothéliales est induite suite à la sécrétion de certains facteurs de croissance synthétisés en réponse à des conditions hypoxiques. Ces molécules tumorales dont la principale est le VEGF sont responsables d'activer les cellules endothéliales via notamment une régulation positive des voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/MAPK déjà mentionnées (Rini et Small, 2005). De ce point de vue, il a été particulièrement intéressant d'évaluer l'effet du TLN-4601 sur ces voies de transduction cellulaire après une induction en milieu conditionné de U87 MG enrichi en facteurs de croissances tumoraux. Il a été démontré par immunobuvardage de type Western qu'en présence de milieu conditionné de U87 les niveaux de phosphorylation de AKT (figure 3.8) et de ERK (figure 3.9) augmente considérablement chez les cellules endothéliales cérébrales. Un traitement à 5 μ M de TLN-4601 inhibe de manière efficace ces voies de signalisation majeures impliquées dans le recrutement des cellules endothéliales au foyer tumoral. Ces résultats suggèrent que le TLN-4601 pourrait inhiber la migration des cellules endothéliales vers une tumeur en agissant sur les voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/MAPK. Cette inhibition de la migration cellulaire pourrait empêcher entre autres le phénomène d'angiogénèse tumorale qui est indispensable à la progression des cancers cérébraux.

Afin de vérifier si TLN-4601 inhibe effectivement le recrutement des cellules endothéliales au foyer tumoral, des essais migratoires à l'aide de chambres de Boyden ont été réalisés (figure 3.11). Les résultats semblent indiquer que TLN-4601 inhibe la migration des cellules endothéliales induites par les différents facteurs de croissance tumoraux présents dans le milieu conditionné des cellules U87 parentales. Nous avons observé une modulation à la baisse d'environ 50% de la migration des HBMEC suite à un prétraitement à une concentration de 5 μ M de TLN-4601 comparé à des cellules non traitées. Ces résultats tiennent en compte du fait que le TLN-4601 induit la mort cellulaire. En effet, lors des essais de migration un compte cellulaire au bleu de Trypan a été réalisé dans le but de mettre le même nombre de cellules vivantes dans les différentes conditions expérimentales. Au niveau moléculaire, cette activité anti-migratoire du

TLN-4601 chez les cellules endothéliales, semble être associée à l'inhibition de la voie de la PI3K/AKT et de la RAS/MAPK telle que démontré précédemment.

L'effet du TLN-4601 sur les niveaux d'ARN_m du gène VEGF chez les glioblastomes parentaux a été étudié par RT-PCR en temps réel (figure 3.12 A), puisque plusieurs thérapies anti-angiogéniques présentement en essais cliniques ciblent tout particulièrement ce facteur de croissance associé au phénomène de la néovascularisation des tumeurs (Norden, Drappatz et Wen, 2008). Selon les résultats, il est possible d'observer une inhibition marquée des niveaux de transcripts primaires du gène de VEGF suite à un traitement au TLN-4601. La figure 3.12 B montre la présence des amplicons générés par la réaction enzymatique d'amplification de l'ADN_c dont la taille est respectivement de 186 paires de bases pour le gène contrôle 18 S et 72 paires de bases pour le gène d'intérêt. La modulation des niveaux transcriptionnels de VEGF suite à un traitement au TLN-4601 suggère que l'action du médicament intervient au niveau de l'ARN_m. Cette régulation à la baisse de l'ARN_m de VEGF impliquerait une diminution de son expression protéique. Bien qu'il ait été pertinent de confirmer cette hypothèse au niveau protéique en utilisant par exemple un test ELISA, ses expériences n'ont toutefois pas été réalisées dans cet ouvrage.

Des essais migratoires de cellules endothéliales induits par un milieu conditionné de U87 MG prétraitées au TLN-4601 laissent croire que le médicament module à la baisse la sécrétion de certains facteurs de croissance tumoraux responsables du recrutement des cellules endothéliales vers le foyer tumoral (figure 3.13A). En fait, la quantification de la migration par analyse microscopique (figure 3.13B) démontre que le TLN-4601 inhibe indirectement la migration des cellules endothéliales en entravant la synthèse de messagers biochimiques relargués par les glioblastomes parentaux dans leur environnement. L'effet du TLN-4601 sur la viabilité des glioblastomes a été pris en considération au cours des essais migratoires. Un nombre égal de cellules vivantes a été déposé dans les différentes chambres de Boyden en effectuant préalablement un compte cellulaire au bleu de Trypan. Cette inhibition pourrait se traduire en condition physiologique par une diminution du recrutement des cellules endothéliales au niveau tumoral, classant ainsi le TLN-4601 comme un agent anti-angiogénique.

3.2.2 Effet du TLN-4601 sur la tubulogénèse

La tubulogénèse est caractérisée comme étant un des mécanismes importants associés à l'angiogénèse. Les cellules endothéliales possèdent la capacité de se différencier en structure capillaire sur une matrice de Matrigel. Cette capacité a été étudiée chez les HBMEC traitées à des doses croissantes de TLN-4601 en absence et présence de sérum (figure 3.14A). Le TLN-4601 inhibe significativement la tubulogénèse des HBMEC à une concentration de 2 et 5 μ M, ce qui suggère que TLN-4601 possède en plus d'une activité anti-migratoire, une action anti-angiogénique. De plus, selon la quantification des réseaux capillaires par microscopie en contraste de phase (figure 3.14B), cet effet semble être encore visible en présence de 10% de sérum, une condition plus proche des paramètres physiologiques normalement retrouvés dans l'environnement des cellules endothéliales. L'effet du TLN-4601 sur la viabilité des glioblastomes a été pris en considération au cours des essais de tubulogénèse. Un nombre égal de cellules vivantes a été déposé dans les différents puits de matrigel en effectuant préalablement un compte cellulaire au bleu de Trypan.

3.3 Cytotoxicité sélective du TLN-4601.

3.3.1 Effet du TLN-4601 sur la mort des glioblastomes et des cellules endothéliales.

En 2006, des études d'affinité par radio-ligand ont démontré qu'en raison de sa structure moléculaire caractéristique, le TLN-4601 se lie de manière sélective aux PBR, une protéine surexprimée dans différents types de tumeurs (Decaudin, 2004). Cette liaison conférerait au médicament une action cytotoxique plus spécifique aux tissus cancéreux qu'aux tissus sains. En effet, une étude *in vivo* réalisée à l'aide de modèles orthotopiques a démontré que le médicament s'accumule préférentiellement au niveau de la tumeur cérébrale plutôt que le cerveau sain dans un rapport 200 pour 1 (Gourdeau *et al.*, 2007). La cytotoxicité du médicament a donc été évaluée respectivement chez les glioblastomes parentaux et les cellules endothéliales à l'aide de dosages enzymatiques de la caspase-3 (figure 3.15B). Selon ces résultats, l'effet cytotoxique du médicament est beaucoup plus important chez les cellules cancéreuses versus les cellules non cancéreuses. Cet effet préférentiel du TLN-4601 semble être corrélé à l'expression du récepteur oncogénique de PBR surexprimé chez les glioblastomes (figure 3.15A). Le manque de sélectivité

est le plus grand défaut des agents chimiothérapeutiques conventionnels utilisés en oncologie. Le TLN-4601 semble être un agent chimiothérapeutique plus spécifique en raison de son action cytotoxique plus intense chez les tissus cancéreux comparativement aux tissus endothéliaux sains.

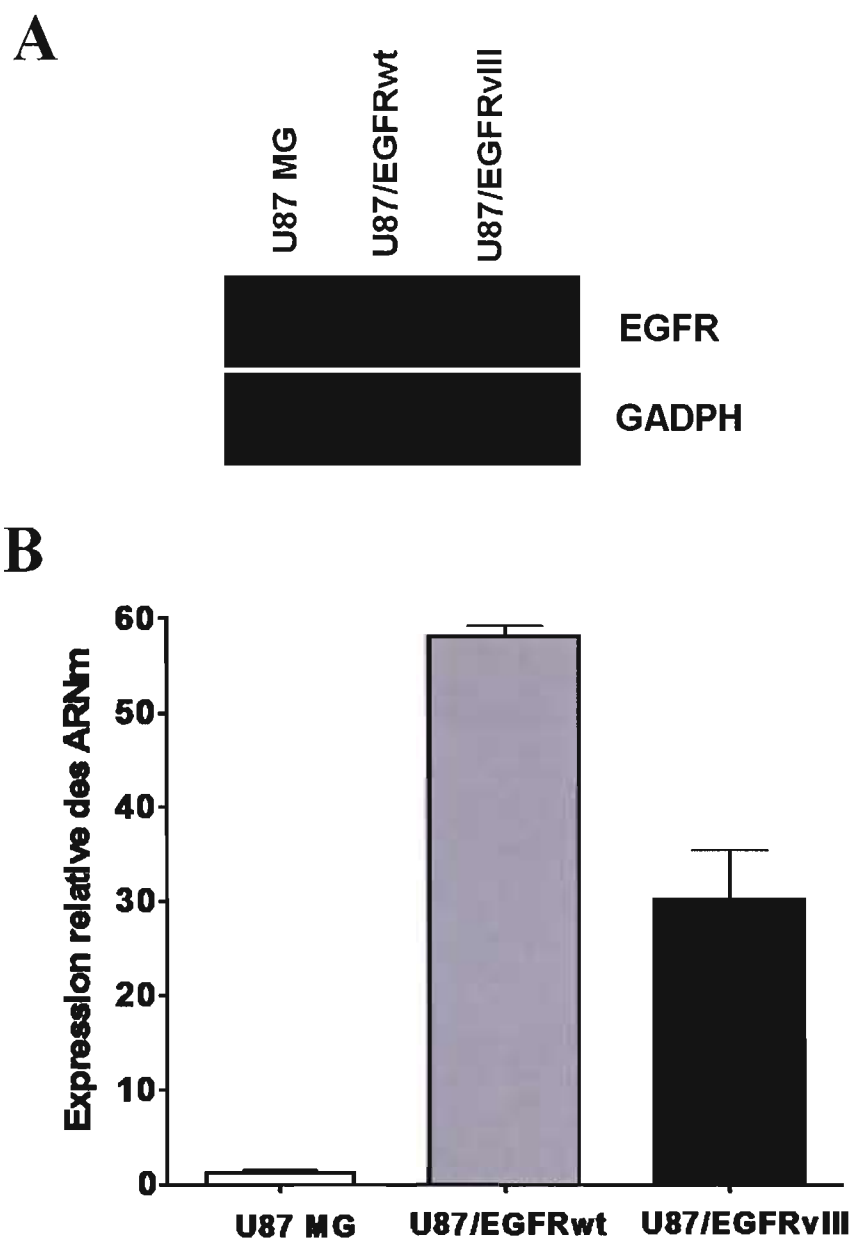


Figure 3.1 : Validation des modèles cellulaires par RT-PCR semi-quantitative et PCR en temps réel.

L'efficacité de transfection des modèles cellulaires a été évaluée par RT-PCR en (A) et par PCR en temps réel en (B). Les cellules U87 MG, U87 EGFRwt, U87 EGFRvIII ont été ensemencées dans des plaques de six puits contenant du milieu DMEM additionné de 10% de SFB. Après 18 heures, l'ARN total des cellules a été isolé et amplifié tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Le tableau III montre les séquences des amorces utilisées lors de l'amplification spécifique d'ADN. Les amplicons obtenues par PCR semi-quantitative ont été séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium et ont été visualisés sous une lumière U.V. tandis que le graphique de l'expression des ARNm a été généré par le logiciel d'exploitation des données IQ5 au cours de la PCR en temps réel.

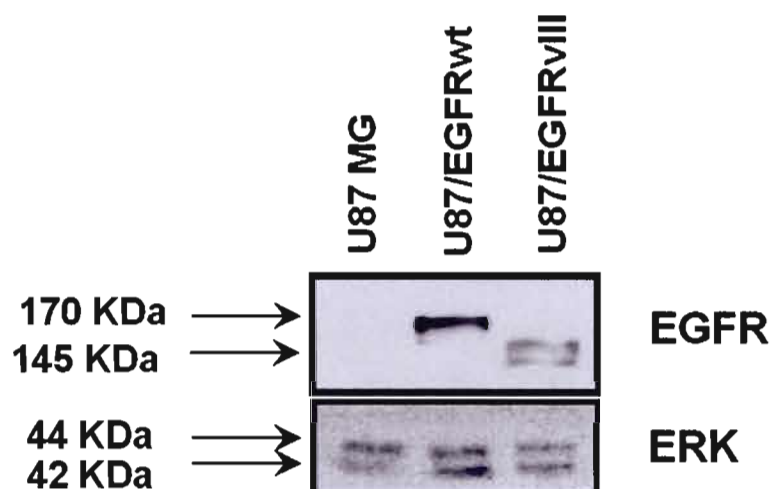


Figure 3.2 : Validation des modèles par immunobuvardage de type western.

Les cellules U87 MG, U87 EGFR wt, U87 EGFR vIII ont été cultivées jusqu'à atteindre 80% de confluence dans des plaques de six puits contenant un milieu DMEM additionné de 10% de SFB. Par la suite, elles ont été récoltées et les protéines des lysats cellulaires ont été séparées par SDS-PAGE en condition dénaturante. L'immunodétection du récepteur à l'EGF (170 kDa et 145 kDa) et de la protéine ubiquitaire ERK (44 KDa, 42 KDa) utilisée comme contrôle interne a été effectuée tel que décrit dans la section Matériel et méthodes.

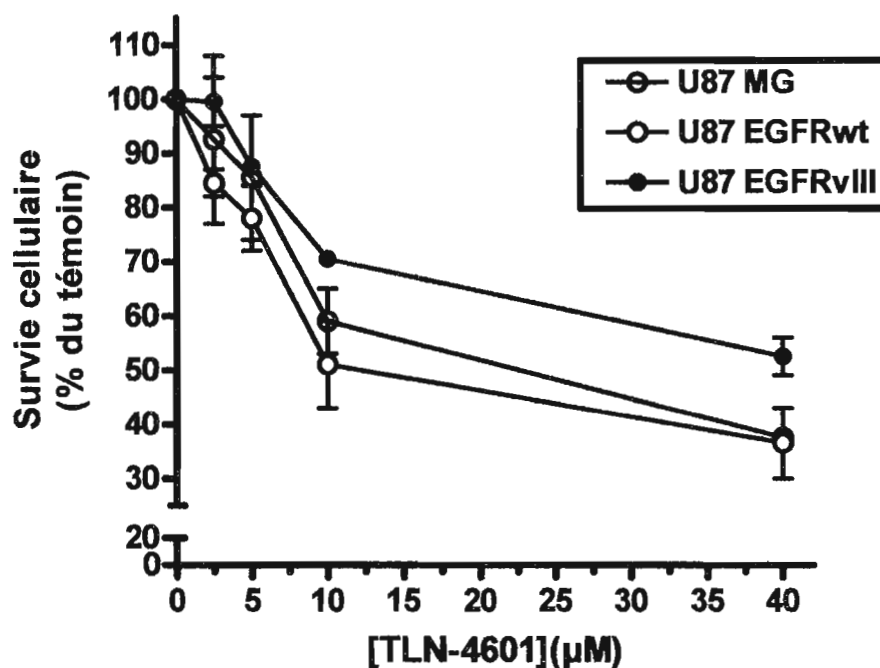


Figure 3.3 : Effect du TLN-4601 sur la viabilité cellulaire des glioblastomes.

L'activité anti-proliférative du TLN-4601 a été évaluée par un test de MTT sur les trois lignées de glioblastomes humains à l'étude. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque de 96 puits contenant du milieu de culture DMEM supplémenté de 10% de SFB. Le jour suivant, différentes concentrations de TLN-4601 ont été ajoutées. Après 72 heures, le réactif de MTT a été additionné dans chaque puits pour obtenir une concentration finale de 0,5 mg/ml. La plaque a par la suite été incubée pendant 4 heures à 37°C. À la fin de l'incubation, le milieu a été remplacé par du DMSO. Finalement, la plaque a été incubée 5 minutes à 37°C, avant d'être lue à une longueur d'onde de 550 nm. L'histogramme montre le pourcentage de survie cellulaire des glioblastomes traités à différentes doses de TLN-4601 pendant 72 heures dans un milieu de culture contenant 10% de sérum

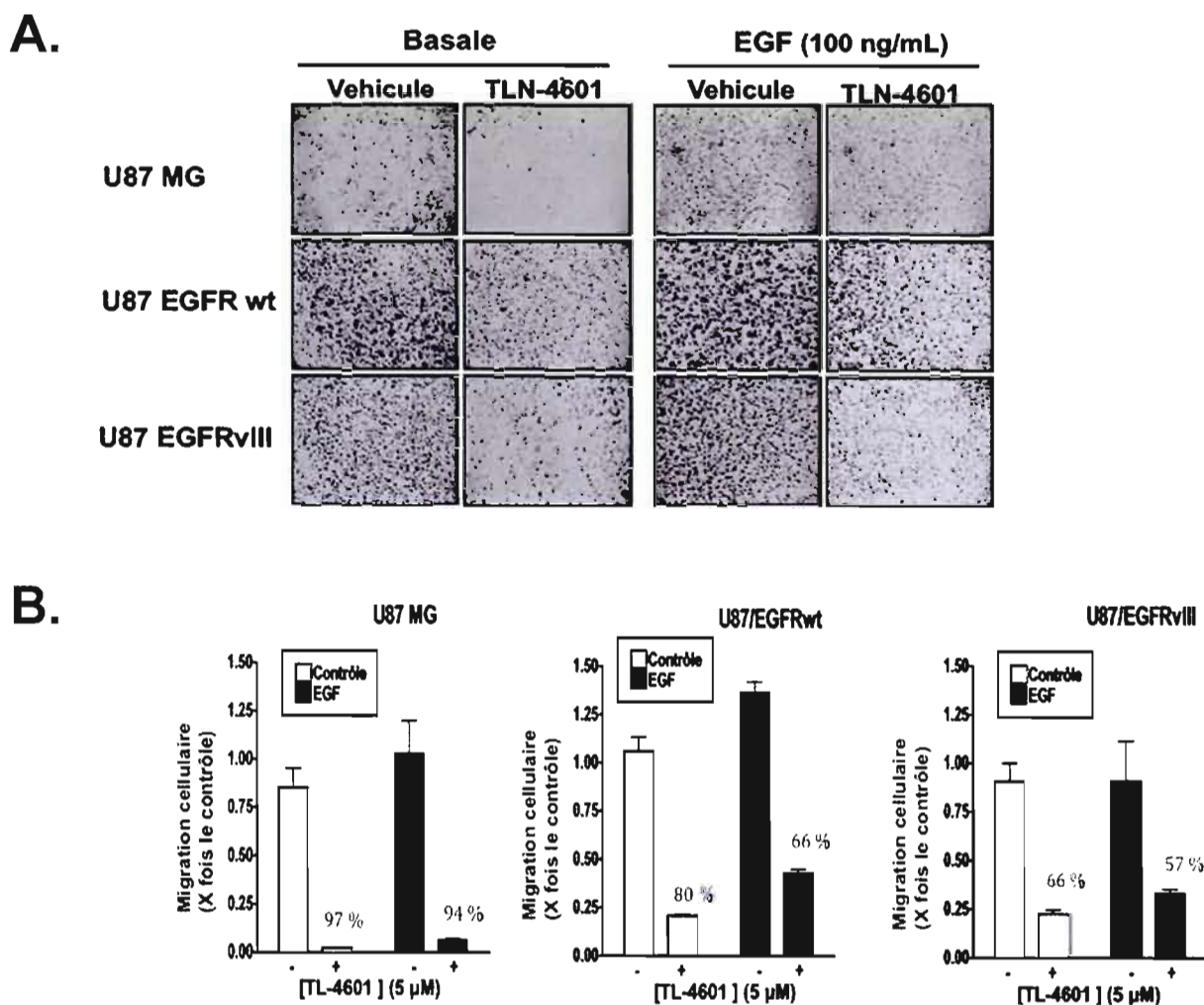


Figure 3.4 : Effet du TLN-4601 sur le potentiel infiltrant des glioblastomes.

Des essais de migration ont été réalisés avec des U87 MG, U87EGFRwt et U87 EGFRvIII prétraitées au TLN-4601 à raison de 5 µM pendant 18 heures dans du milieu de culture DMEM. Par la suite, ces cellules ont été trypsinisées, resuspendues et déposées sur des filtres préalablement revêtus de gélatine en présence et absence d'EGF à une concentration de 100 ng/mL. La migration a ensuite été initiée et arrêtée après 6 heures à l'aide d'une solution 10% formalin phosphate. Les cellules ont été colorées au cristal violet et celles ayant migrées dans le compartiment inférieur du filtre ont été photographiées à un grossissement 100X et comptabilisées à l'aide du logiciel Northern Eclipse. (B) Les histogrammes montrent l'inhibition de la migration cellulaire suite à un traitement au TLN-4601. Les valeurs correspondent au nombre de cellules comptées dans quatre champs optiques représentatifs pour chacune des conditions.

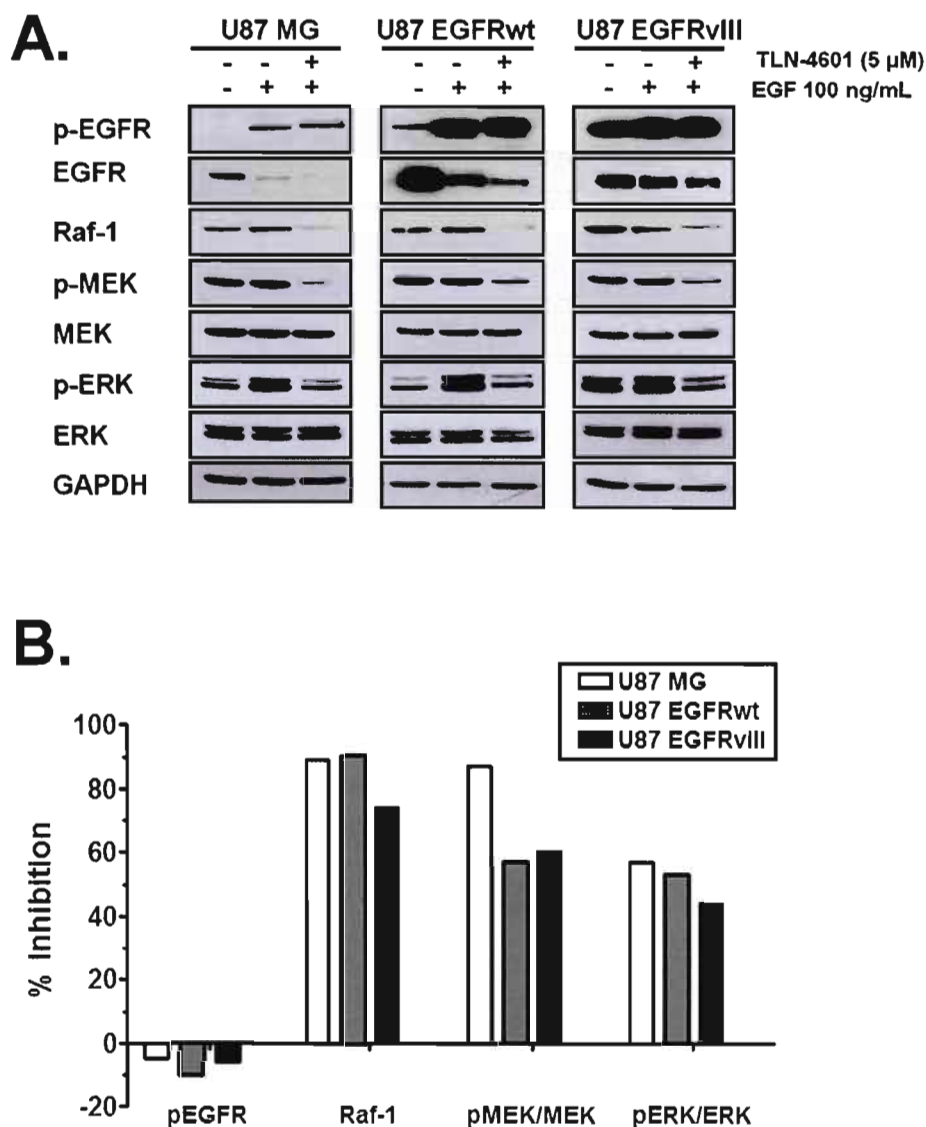


Figure 3.5 : Effet du TLN-4601 sur la voie des MAPK chez les glioblastomes.

Des cellules U87 MG, U87 EGFRwt et U87 EGFRvIII ont été ensemencées dans des pétris de 100 mm contenant du milieu DMEM 10 % SFB. Après 24 h, le milieu a été enlevé et les cellules ont été traitées pendant 18 heures avec 5 μ M de TLN-4601 dans un milieu 0,1% SFB. Après traitement les cellules ont été stimulées pendant 1 min à l'EGF 100 ng/ml et ont été rapidement récoltées et lysées. (A) Le contenu protéique des lysats a été analysé par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre pEGFR, EGFR, Raf-1, pMEK, MEK, pERK et ERK. (B) L'histogramme représente le pourcentage d'inhibition du niveau protéique de pEGFR, Raf-1, pMEK/MEK et pERK/ERK dans les cellules prétraitées au TLN-4601 par rapport aux cellules non traitées suite à la stimulation à l'EGF.

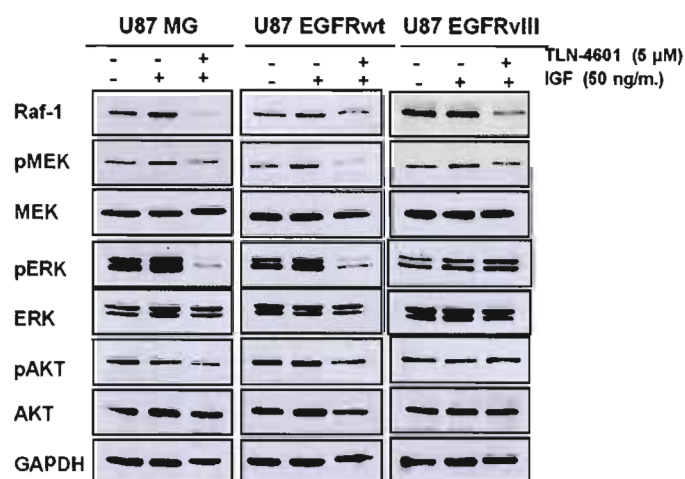
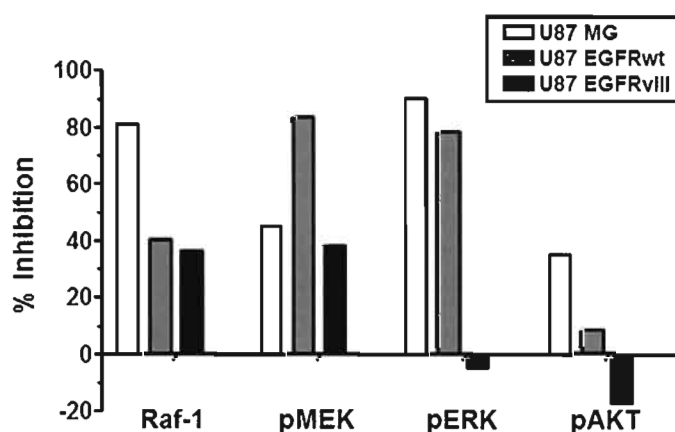
A.**B.**

Figure 3.6 : Effet du TLN-4601 sur la voie des MAPK et la voie PI3K/AKT des glioblastomes.

Des cellules U87 MG, U87 EGFRwt et U87 EGFRvIII ont été ensemencées dans des pétris de 100 mm contenant du milieu DMEM 10 % SFB. Après 24 h, le milieu a été enlevé et les cellules ont été traitées pendant 18 heures avec 5 μ M de TLN-4601 dans un milieu 0,1 % SFB. Après traitement les cellules ont été stimulées pendant 5 min à l'IGF 50 ng/ml et ont été rapidement récoltées et lysées. (A) Le contenu protéique des lysats a été analysé par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques dirigées contre Raf-1, pMEK, MEK, pERK et ERK, pAKT, AKT et GAPDH. (B) L'histogramme représente le pourcentage d'inhibition du niveau protéique de Raf-1, pMEK/MEK, pERK/ERK et pAKT/AKT dans les cellules prétraitées au TLN-4601 par rapport aux cellules non traitées suite à la stimulation à l'IGF.

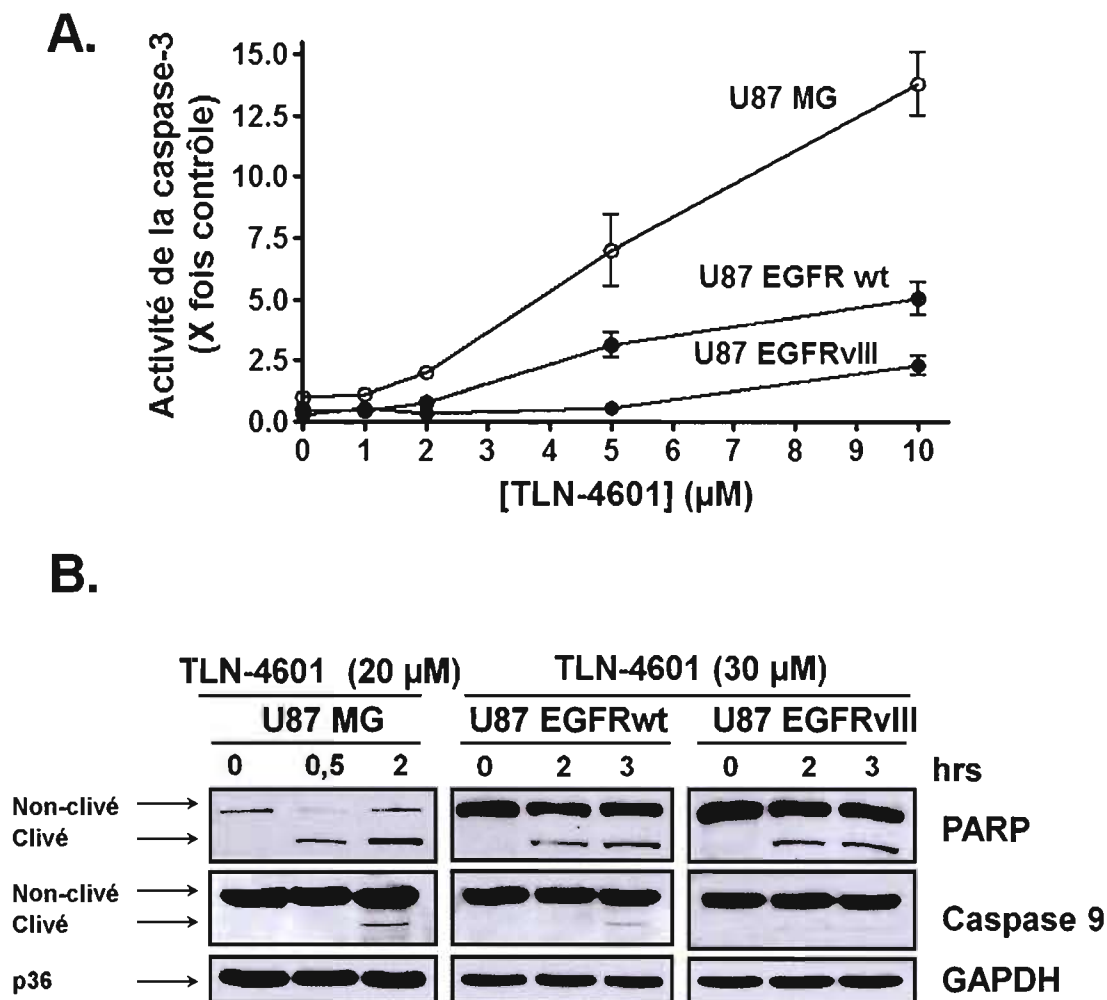


Figure 3.7 : Effet du TLN-4601 sur la mort cellulaire des glioblastomes via un mécanisme d'apoptose dépendant des caspases.

(A) Dosage enzymatique de la caspase-3 pour déterminer la sensibilité des modèles cellulaires au TLN-4601. Des cellules U87 MG, U87 EGFRwt et U87 EGFRvIII ont étéensemencées dans des plaques de six puits contenant du milieu DMEM additionné de 10 % de SFB. Le jour suivant, ces cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de TLN-460 durant 18 heures dans un milieu exempt de sérum. Après cette période d'incubation, l'activité de la caspase-3 a été mesurée à l'aide d'une trousse commerciale tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. En (B), des cellules U87 MG ont été traitées à 20 μM de TLN-4601 tandis que les lignées recombinantes (U87 EGFRwt et U87 EGFRvIII) ont été traitées à 30 μM pendant différents temps dans un milieu DMEM contenant 0.1 % SFB. Finalement, les cellules ont été récoltées et le contenu protéique a été analysé par immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps spécifiques dirigés contre PARP, la caspase-9 et GAPDH.

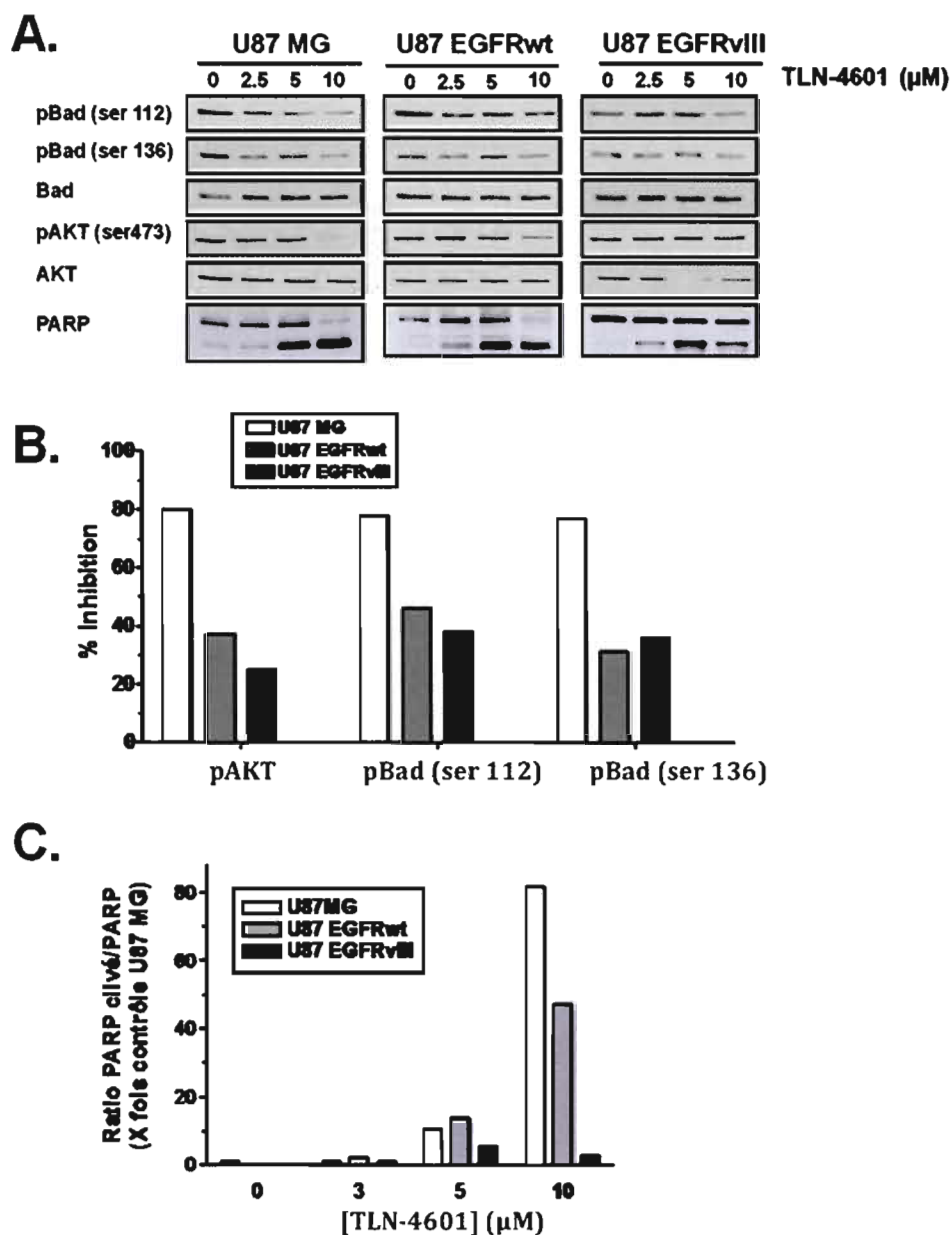


Figure 3.8 : Effet du TLN-4601 sur la mort cellulaire des glioblastomes via la voie PIK3/AKT.

Des cellules U87 MG, U87 EGFRwt et U87 EGFRvIII ont été traitées pendant 6 heures avec des doses croissantes de TLN-4601 dans un milieu 0,1% SFB. **(A)** Le contenu protéique des lysats a été analysé par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre pAKT, AKT, Raf-1, pBad (ser112), pBad (ser136) et Bad. **(B)** Histogramme représentant le pourcentage d'inhibition du niveau protéique de pAKT/AKT, Raf-1, pBad (ser112)/BAD et pBad (ser136)/BAD dans les cellules traitées à 10 μ M de TLN-4601 par rapport aux cellules non traitées. **(C)** Histogramme indiquant le ratio du fragment clivé de PARP (85 KDa) sur la proenzyme (116 KDa) en fonction de la dose de TLN-4601 pour les trois lignées cellulaires à l'étude.

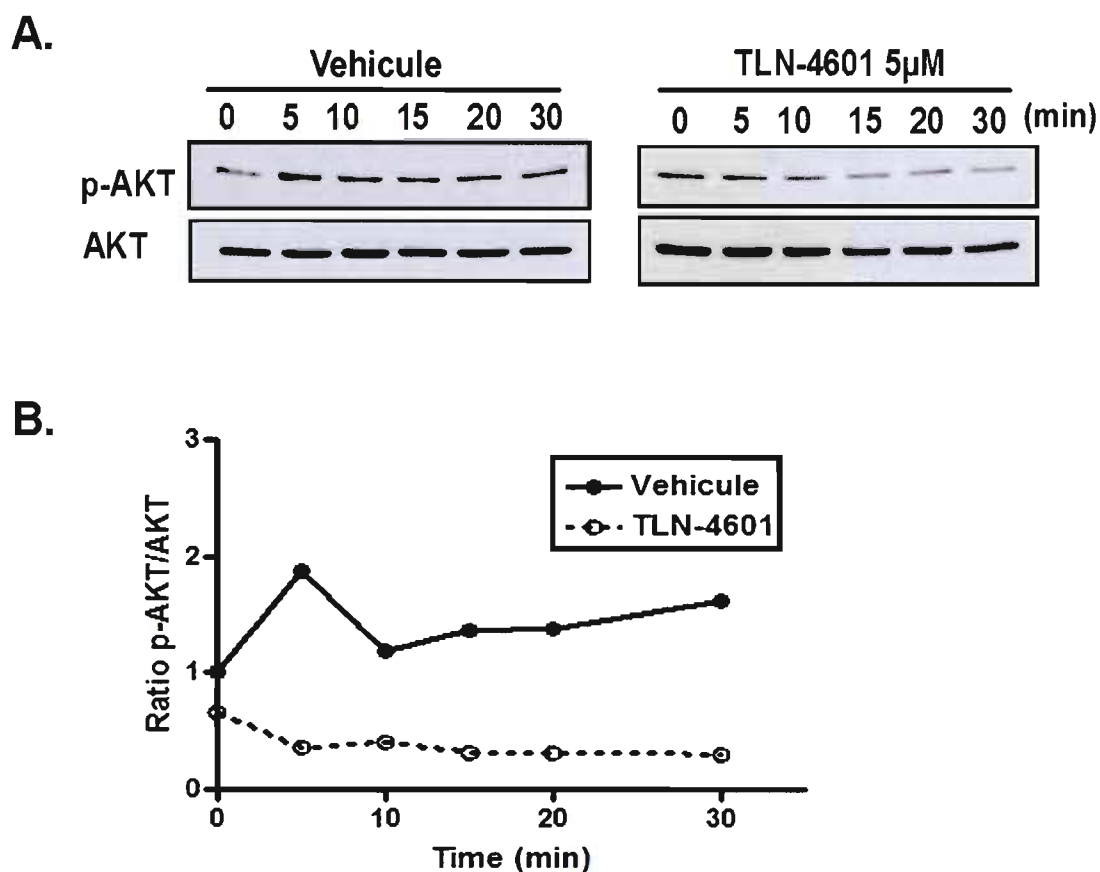


Figure 3.9 : Effet du TLN-4601 sur la voie de la PI3K/AKT chez les cellules endothéliales en présence de milieux conditionnés de U87.

Des cellules HBMEC non traitées et prétraitées au TLN-4601 durant 18 heures ont été stimulées avec du milieu conditionné de U87 MG à différents temps. Ces cellules endothéliales ont ensuite été récoltées et le contenu protéique a été séparé par SDS-PAGE en condition dénaturante. L'immunodétection de p-AKT et AKT en (A) a été réalisée tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes. L'expression relative du ratio de la forme phosphorylée sur la forme totale de la protéine d'intérêt a été calculée en (B) suite à une analyse densitométrique.

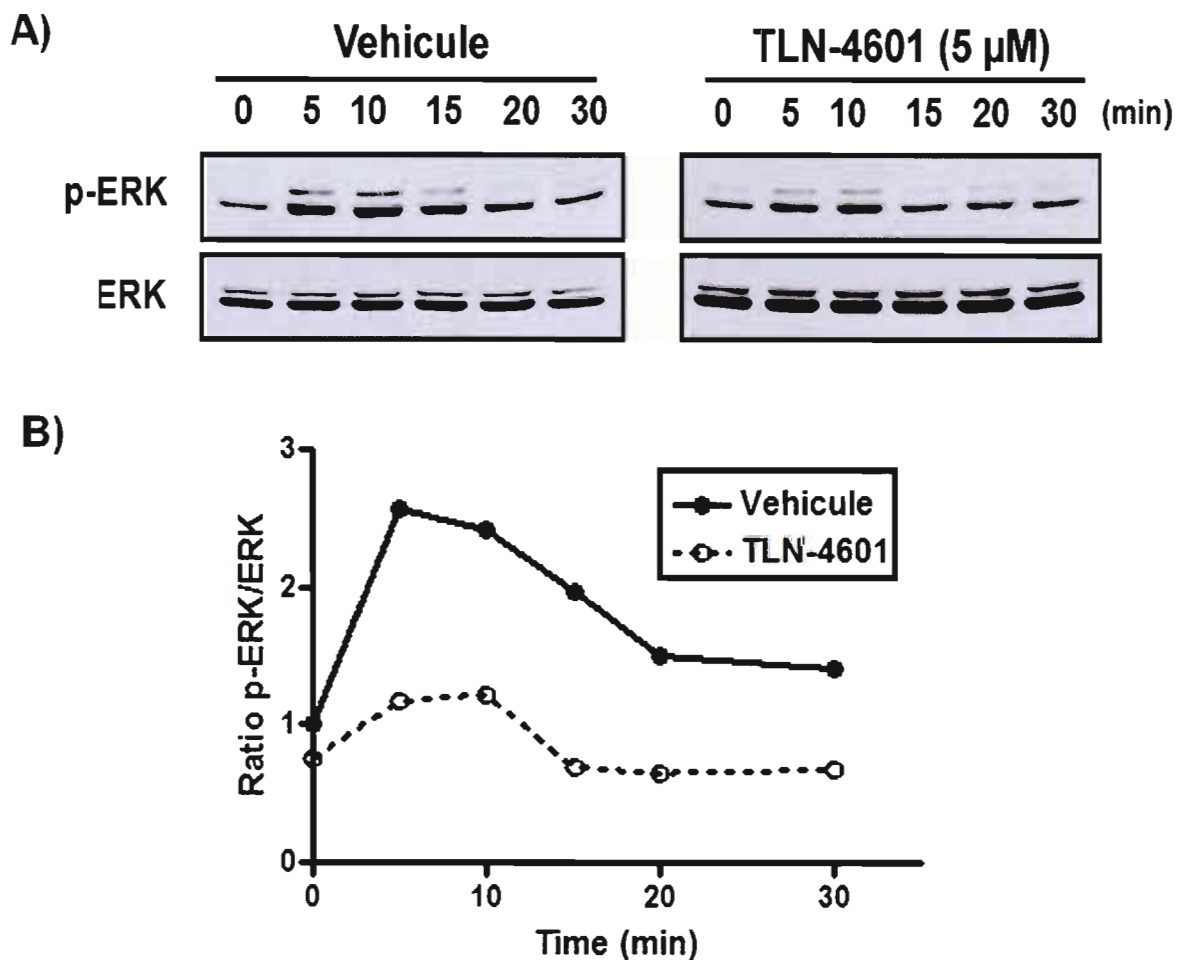


Figure 3.10 : Effet du TLN-4601 sur la voie des MAPK chez les cellules endothéliales en présence de milieux conditionnés de U87.

Des cellules HBMEC non traitées et prétraitées au TLN-4601 durant 18 heures ont été stimulées avec du milieu conditionné de U87 MG à différents temps. Ces cellules endothéliales ont ensuite été récoltées et le contenu protéique a été séparé par SDS-PAGE en condition dénaturante. L'immunodétection de pERK (44 KDa, 42 KDa) et ERK (44 KDa, 42 KDa) en (A) a été réalisé tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. L'expression relative du ratio de la forme phosphorylée sur la forme totale de la protéine d'intérêt a été calculée en (B) suite à une analyse densitométrique.

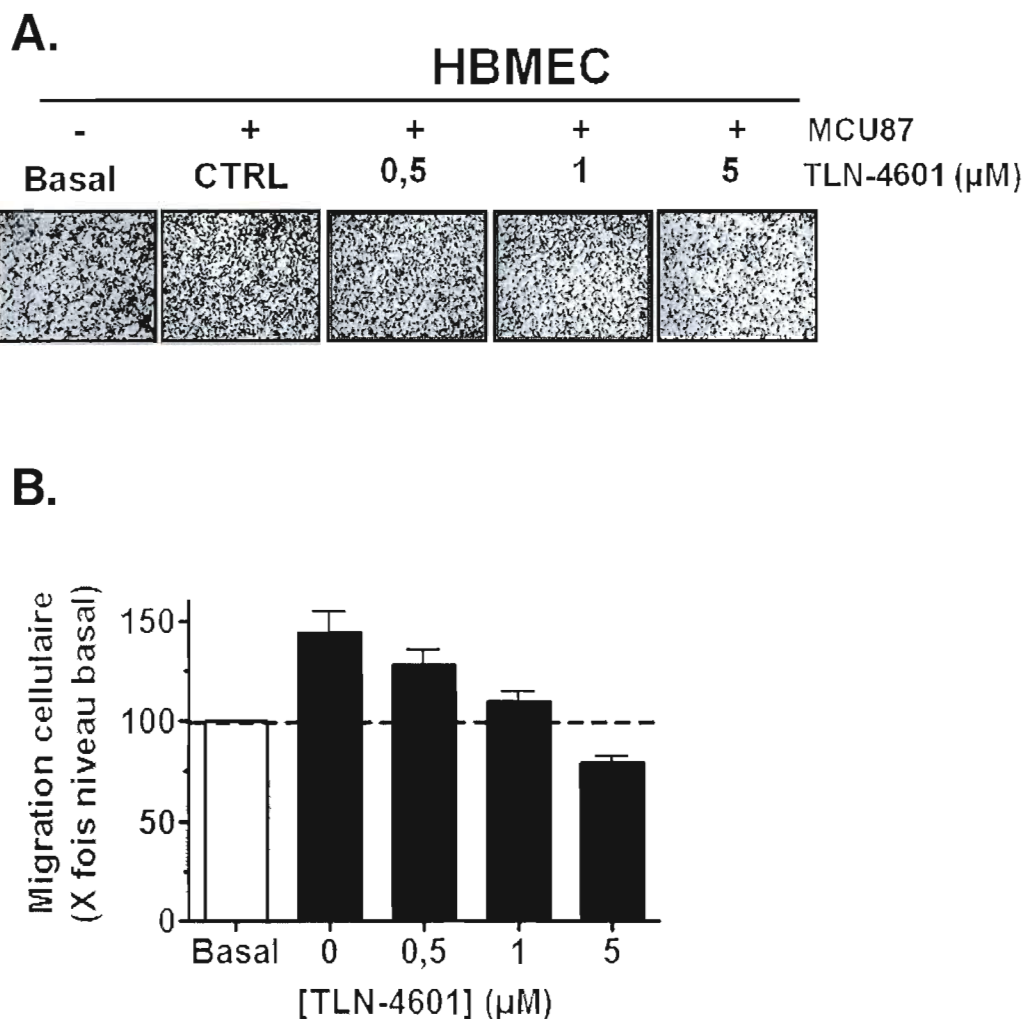


Figure 3.1 : Effet du TLN-4601 sur la migration des cellules endothéliales.

Des HBMEC ont été prétraitées à différentes doses de TLN-4601 durant 18 heures dans un milieu de culture exempt de sérum. La migration de ces cellules a ensuite été réalisée en utilisant comme chémoattractant le milieu conditionné des cellules cancéreuses U87 MG enrichi en facteurs de croissance (MC U87). Par la suite, la migration a été arrêtée et les cellules endothéliales ont été fixées au formaldéhyde pour être finalement colorées au cristal violet. Les cellules ayant traversées dans le compartiment inférieur du filtre des chambres de Boyden ont été photographiées à un grossissement 100X en (A) et ont été comptabilisées à l'aide du logiciel Northern Eclipse en (B). Les valeurs de l'histogramme correspondent au nombre de cellules comptées dans quatre champs optiques représentatifs de chacune des conditions.

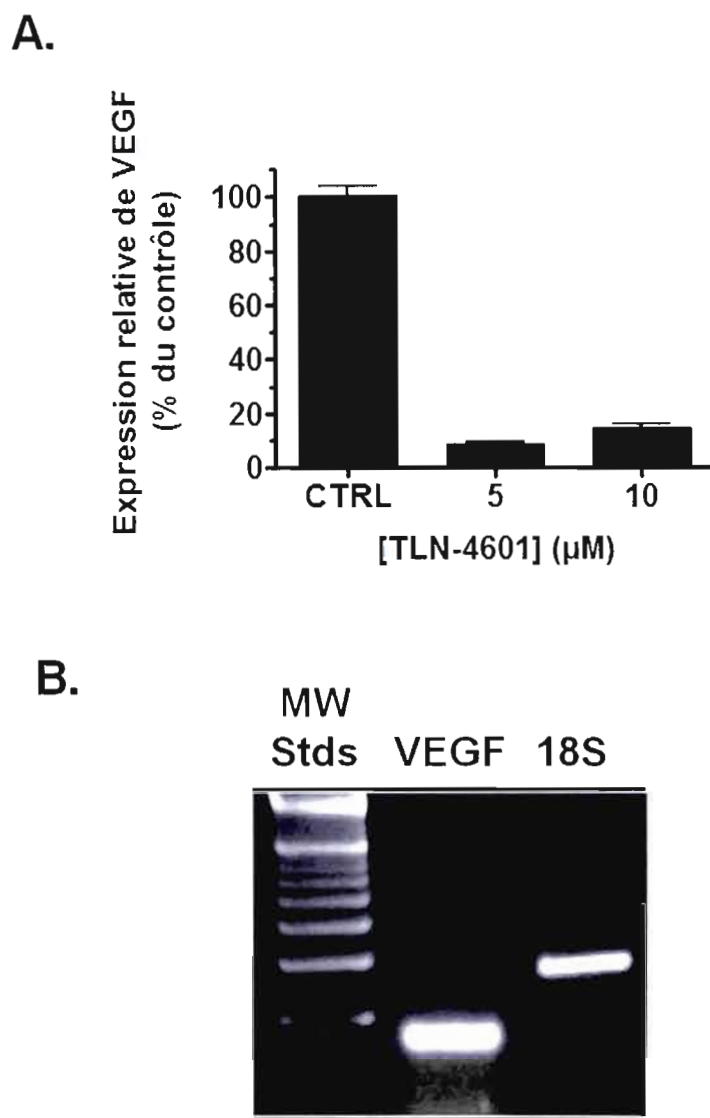


Figure 3.12 : Effet du TLN-4601 sur les niveaux d'expression d'ARNm du VEGF synthétisé par les glioblastomes parentaux.

Le niveau des transcrits primaires du gène VEGF des U87 MG non-traitées et traitées au TLN-4601 à raison de 5 µM et 10 µM durant 18 heures a été déterminé par PCR en temps réel. L'ARN total des cellules a été isolé et amplifié tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Le tableau III montre les séquences des amorces utilisées lors de l'amplification spécifique de l'ADN_c. Le graphique de l'expression génique relative en (A) a été généré par le logiciel d'exploitation des données IQ5 au cours de la PCR en temps réel. Les amplicons obtenus par PCR ont ensuite été séparés en (B) par une électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium et visualisés sous une lumière UV.

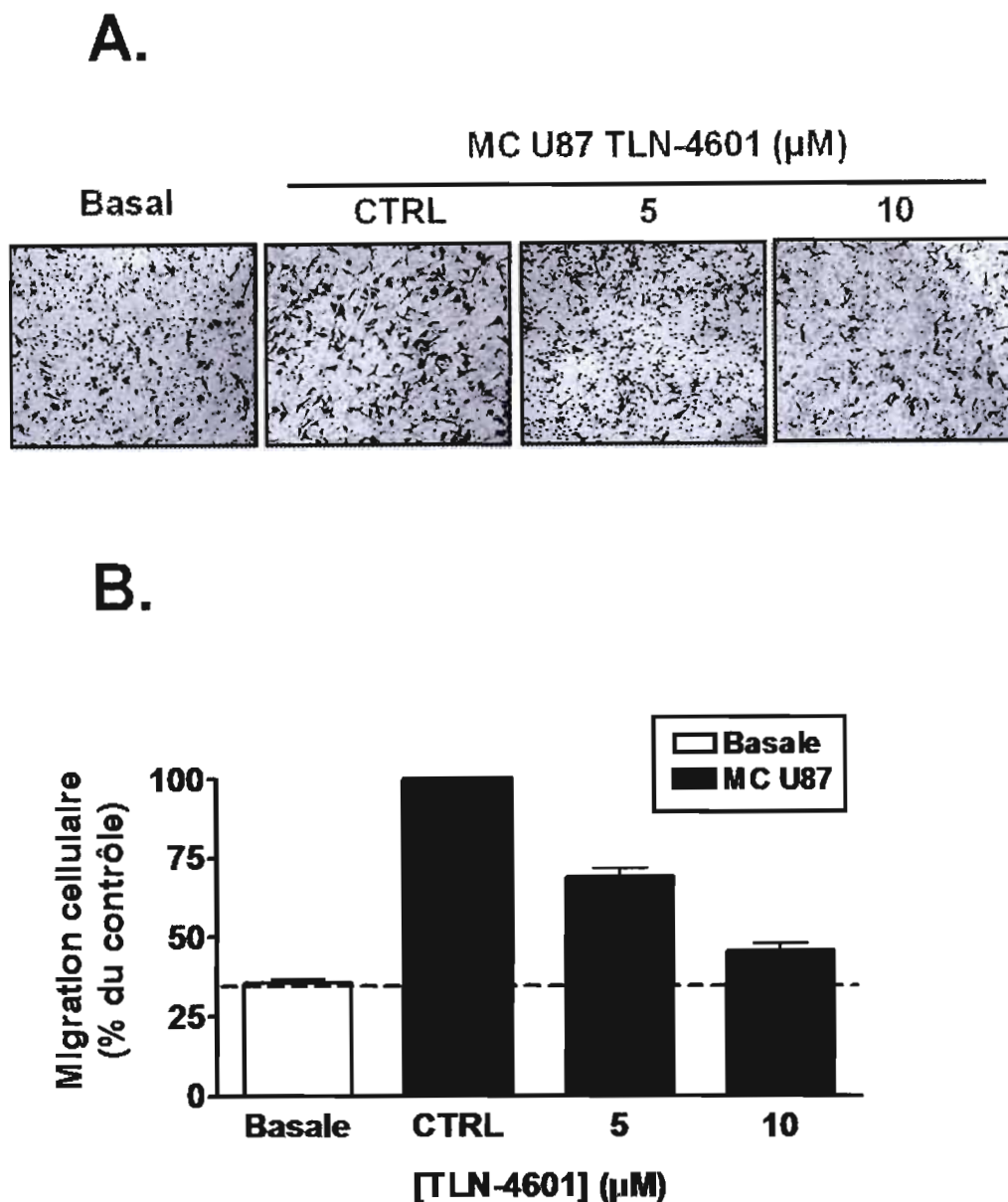


Figure 3.13 : Effet du TLN-4601 sur les facteurs de croissances pro-migratoires sécrétés par les U87 MG.

Des U87 MG ont été prétraitées à 0, 5 et 10 μM de TLN-4601 durant 18 heures dans un milieu DMEM de culture exempt de sérum. Par la suite, le milieu de culture enrichi en facteurs de croissance tumoraux a été prélevé pour être utilisé en tant que chémoattractant et initier la migration des HBMEC. La migration a été arrêtée après 6 heures et les cellules endothéliales ont été fixées au formaldéhyde pour être finalement colorées au cristal violet. Les cellules ayant traversées dans le compartiment inférieur du filtre des chambres de Boyden ont été photographiées à un grossissement 100X en (A) et ont été comptabilisées à l'aide du logiciel Northern Eclipse en (B). Les valeurs correspondent au nombre de cellules comptées dans quatre champs optiques représentatifs pour chacune des conditions.

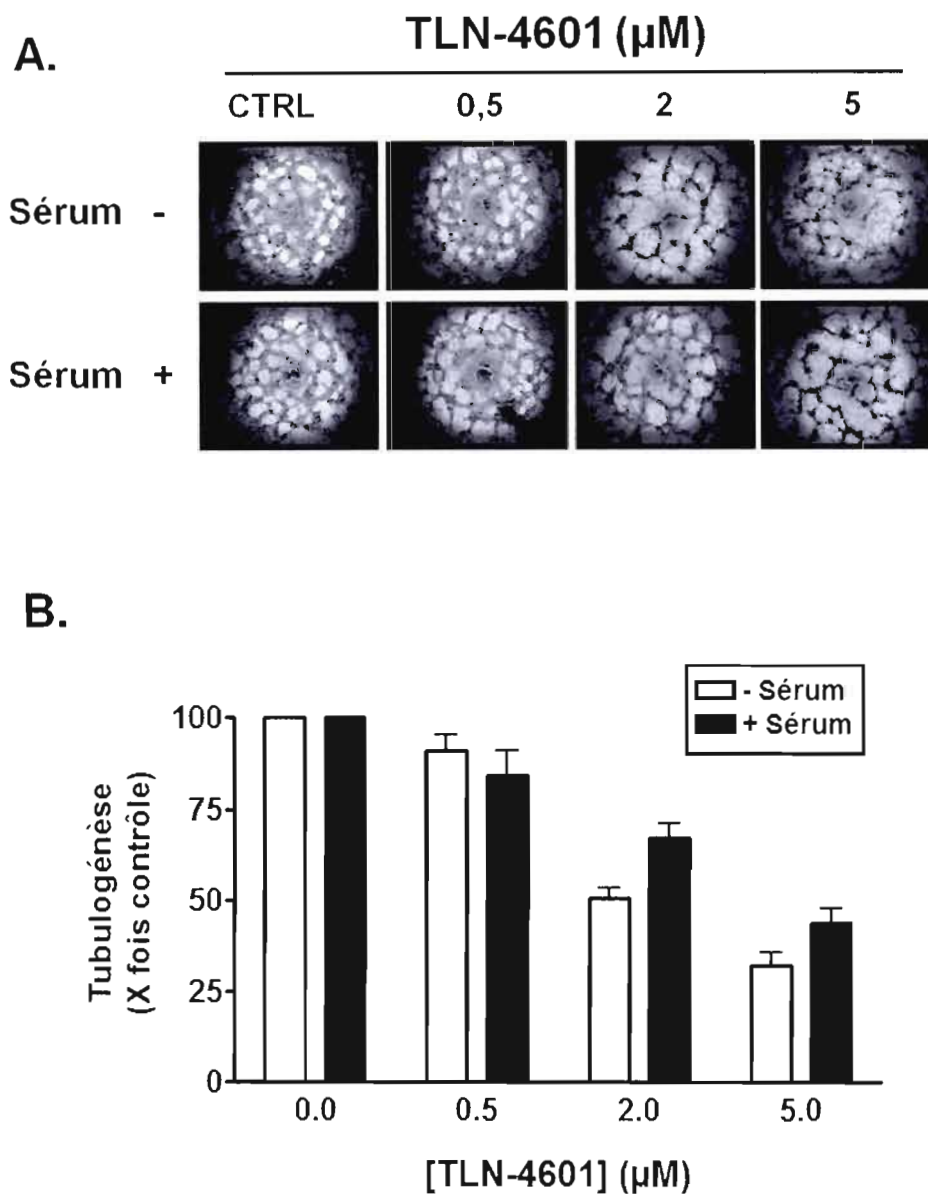


Figure 3.14 : Effet du TLN-4601 sur la formation de capillaires des cellules endothéliales.

Des cellules HBMEC ont été prétraitées à différentes concentrations de TLN-4601 durant 18 heures dans un milieu de culture RPMI exempt de sérum ou contenant du sérum. Elles ont ensuite été trypsinisées et déposées sur Matrigel. En (A) des photographies de la formation de capillaire après 72 heures ont été prises par microscopie à contraste de phase à un agrandissement 40 X. En (B), la complexité du réseau a été analysée à l'aide d'une calculatrice échelle de carte du logiciel Northern Eclipse. Pour effectuer l'analyse, six champs optiques ont été visualisés à un grossissement 100X.

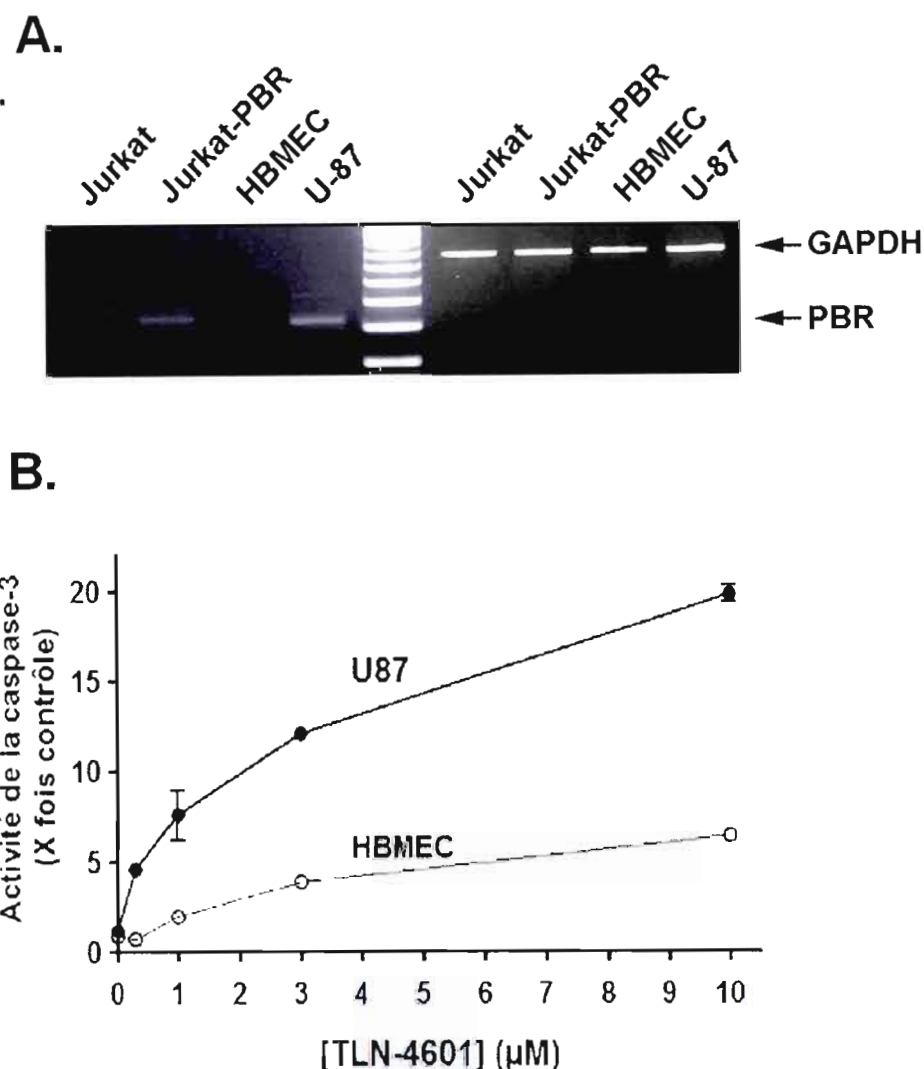


Figure 3.15 : Toxicité préférentielle du TLN-4601 sur les cellules cancéreuses surexprimant PBR.

Le niveau basal de transcrit primaire du gène PBR des HBMEC et des U87 MG a été déterminé par RT-PCR semi-quantitative en (A). L'ARN total des cellules a été isolé et amplifié tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Le tableau III montre les séquences des amorces utilisées lors de l'amplification spécifique de l'ADN_c. La séparation électrophorétique des produits de PCR a été réalisée sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium et les amplicons ont été visualisés sous une lumière U.V. L'amplification du gène ubiquitaire GAPDH a été utilisée comme contrôle interne de l'intégrité et de la quantité des ADN_c chargé sur le gel. En (B), la cytotoxicité préférentielle du TLN-4601 vis-à-vis les cellules tumorales plutôt que les cellules endothéliales a été déterminé par un dosage enzymatique de la caspase-3. Des cellules HBMEC et U87 MG ont été traitées avec des concentrations croissantes de TLN-460 durant 18 heures. Après cette période d'incubation, l'activité de la caspase-3 a été mesurée à l'aide d'une trousse commerciale.

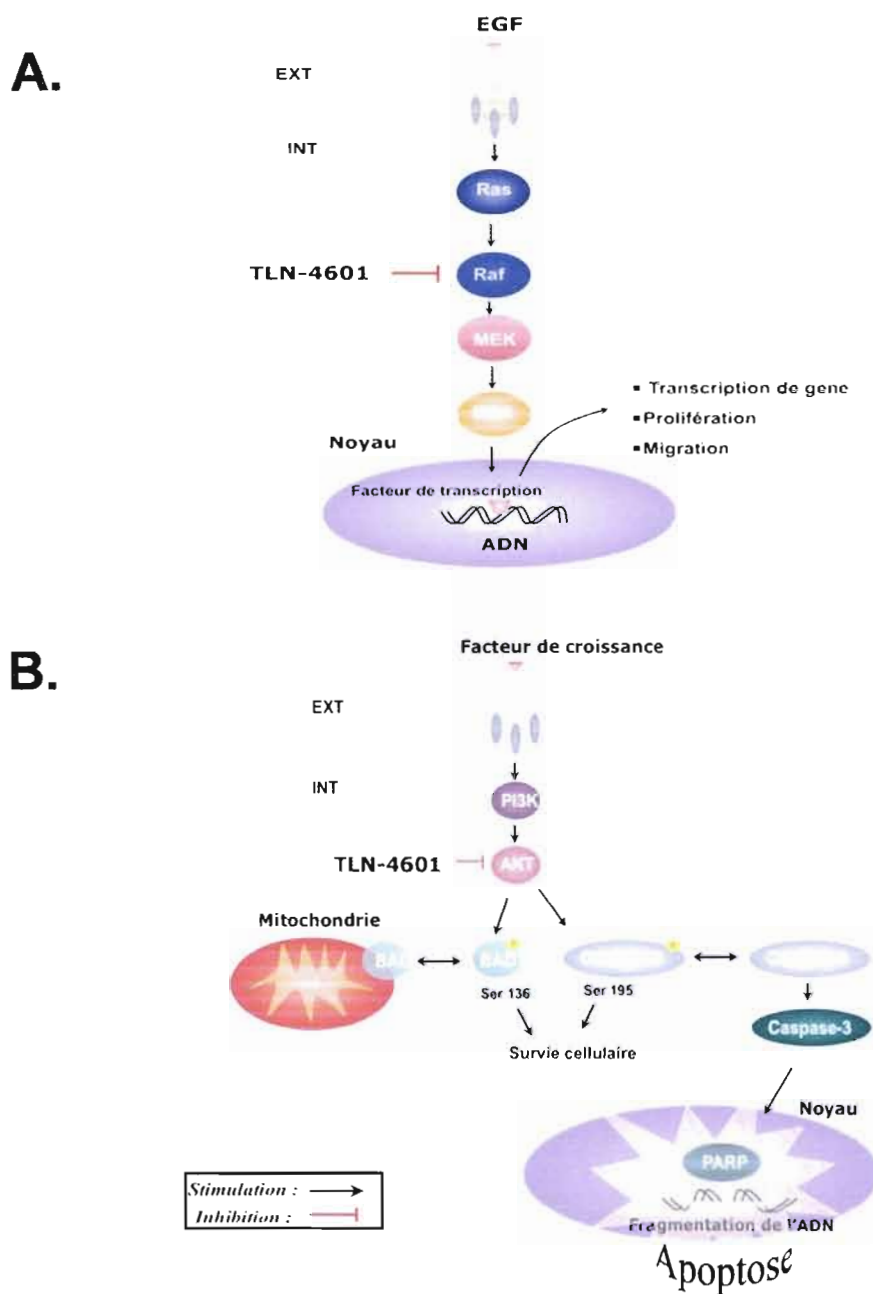


Figure 3.16 : Modèle du mécanisme d'action de TLN-4601.

Le TLN-4601 est un inhibiteur des voies de transduction cellulaire RAS/MAPK (A) et PI3K/AKT (B). Le TLN-4601 entraîne une modulation à la baisse de l'expression protéique de RAF-1 qui se traduit par une diminution des niveaux de phosphorylation de ERK. Le médicament induit également la mort des cellules tumorales via un processus apoptotique. Ce phénomène a été caractérisé par une modulation à la baisse des sites de phosphorylation de BAD, une augmentation de l'activité caspasiq et un clivage de PARP.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Potentiel thérapeutique du TLN-4601 sur les glioblastomes humains.

4.1.2 TLN-4601 inhibe le phénotype infiltrant des glioblastomes humains.

Plusieurs études ont démontré qu'un des changements génétiques importants qui caractérise le glioblastome primaire est l'amplification du gène EGFR. Le gène EGFR code pour un récepteur membranaire de facteurs de croissance qui initie une cascade d'événements aboutissant à la transmission d'un signal de prolifération tumorale (Tang, Steck et Yung, 2007; Ohgaki, 2007; Ziegler *et al.*, 2008). L'amplification de ce gène chez les gliomes provoque une action décuplée du récepteur, ce qui confère aux cellules tumorales un avantage de prolifération. Dans les glioblastomes primaires, certains réarrangements du gène mènent à la synthèse d'un récepteur tronqué, EGFRvIII, actif en permanence et échappant à toute régulation (Grandal *et al.*, 2007; Mellinghoff *et al.*, 2005). Dans le but d'évaluer le potentiel thérapeutique *in vitro* du TLN-4601 sur les GBM, nous avons utilisé comme modèle cellulaire des lignées U87 recombinantes plus agressives surexprimant le gène EGFRwt ou le gène EGFRvIII dans le but de maintenir les niveaux d'expression des récepteurs reflétant ceux d'une tumeur cérébrale, puisque ces phénotypes tumoraux sont rapidement perdus en culture (Nishikawa *et al.*, 1994). Les résultats obtenus par analyses RT-PCR et par immunobuvardage de type western valident la surexpression du récepteur membranaire chez les lignées transfectées comparativement à la lignée parentale. De plus, la présence de la forme tronquée de récepteur protéique a bel et bien été détectée chez la lignée U87 EGFRvIII par une analyse d'immunobuvardage de type western.

Le phénotype extrêmement invasif des glioblastomes fait en sorte que le traitement de ses tumeurs est un défi de taille. En effet, l'invasion du parenchyme normal environnant du cerveau est la cause principale de la récurrence de cette maladie (Mikkelsen *et al.*, 1998; Stummer *et al.*, 2006). L'inhibition significative de cette caractéristique pathologique par le TLN-4601 chez les trois modèles cellulaires de glioblastomes est par conséquent une percée significativement majeure. Cette action anti-invasive du médicament semble être corrélée au niveau moléculaire avec l'inhibition de la voie de signalisation RAS/MAPK. En fait, les analyses par immunobuvardage de type western montrent qu'un traitement au TLN-4601 entraîne une

modulation à la baisse de l'expression protéique de RAF-1 qui se traduit par une diminution des niveaux de phosphorylation de ERK. Il est bien établi dans la littérature que la forme active de la kinase ERK peut activer plusieurs facteurs de transcription associés à la migration cellulaire soit en influençant les niveaux transcriptionnels de molécules pro-migratoires ou en activant directement des enzymes nécessaires à la locomotion des cellules (Hood et Cheresch, 2002; May et Hill, 2008). À la lumière de ses résultats, nous avons postulé que l'effet inhibiteur du médicament sur la voie RAS/MAPK cause une diminution du caractère infiltrant des cellules astrocytaires. Toutefois, il faudrait réaliser d'autres expériences afin de corroborer notre hypothèse de travail. Par exemple, il aurait été pertinent d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de la voie RAS/MAPK en parallèle avec le TLN-4601 dans le but de confirmer que l'action anti-invasive du médicament est en partie imputable à l'inhibition de cette voie de signalisation. Il aurait également été possible de réguler à la baisse l'expression génétique de Raf-1 à l'aide la technologie des ARNs silencieux (siARN). Cette expérience aurait permis de valider que le potentiel migratoire accru des glioblastomes est fortement diminué lorsqu'une des cibles du médicament n'est plus exprimée. D'autre part, l'étude de cet axe de signalisation indique que TLN-4601 n'affecte pas de manière significative l'activation du récepteur EGFR par son ligand, mais agit plutôt en aval de la voie de signalisation et plus spécifiquement en dégradant la kinase RAF-1 et en inhibant ainsi plusieurs événements intracellulaires tels que la prolifération et la migration (May et Hill, 2008). Cependant à partir de ces résultats, il est impossible de déterminer si d'autres événements moléculaires précédant la dégradation de RAF-1 sont responsables de l'effet thérapeutique de l'agent anti-cancéreux. Des plus amples études sur l'activité de RAS, une GTPase en amont de la voie de signalisation, pourrait répondre à cette interrogation. D'ailleurs, cette petite protéine G est une cible intéressante dans le développement de nouvelles stratégies de chimiothérapie (Voet et Voet, 2007). Il serait également intéressant d'investiguer si la dégradation de la kinase RAF-1 est régulée au niveau protéique ou au niveau transcriptionnel, toutefois ces expériences n'ont pas été réalisées au cours de cet ouvrage. Finalement, l'effet inhibiteur du TLN-4601 sur la voie RAS/MAPK explique la diminution du potentiel migratoire accru des glioblastomes, un phénotype tumoral responsable de la récurrence de cette maladie. L'inhibition de ces kinases oncogéniques semble être néanmoins plus faible chez les U87 EGFRvIII, mimant des GBM plus agressifs, suggérant ainsi une résistance plus marquée de cette lignée aux effets de la molécule. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la lignée variante EGFRvIII envoie un signal de survie plus intense comparativement aux deux autres lignées cellulaires à l'étude. Il est donc normal qu'une dose plus importante de TLN-4601 soit nécessaire pour obtenir un effet inhibiteur similaire sur la voie RAS/MAPK chez les U87 EGFRvIII.

La voie de signalisation PI3K/AKT est fréquemment activée de façon aberrante chez les glioblastomes suite à des mutations somatiques du gène suppresseur de tumeur PTEN. La voie de transduction cellulaire PI3K/AKT est régulée négativement par l'activité de la phosphatase PTEN qui est absente dans un certain nombre de cancers humains (Joy *et al.*, 2003). L'action antagoniste de PTEN empêche les cellules de se diviser trop rapidement et de manière incontrôlée. De récentes études ont aussi démontré que la sérine/thréonine kinase AKT, généralement reconnue pour son rôle dans la survie cellulaire, serait également impliquée dans des mécanismes migratoires chez les glioblastomes (Joy *et al.*, 2003; Chandrasekar *et al.*, 2003). Ces résultats sont également en accord avec le fait que les mutations dans PTEN sont associées à un phénotype plus infiltrant des tumeurs cérébrales (Ducray, 2008; Idbaih *et al.*, 2008). En se basant sur ces informations, nous avons postulé que l'effet inhibiteur du TLN-4601 sur la voie de signalisation PI3K/AKT observé chez les lignées de glioblastomes contribue également aux propriétés anti-invasives de cet agent anti-cancéreux. D'autre part, l'analyse de la voie de signalisation PI3K/AKT par immunobuvardage de type western indique que les glioblastomes mutants U87 EGFRvIII sont moins sensibles à l'activité thérapeutique de la molécule, puisque le médicament inhibe plus faiblement la forme active d'AKT et semble même l'induire en présence d'IGF. Il est à noter que la modulation de la sérine/thréonine kinase AKT peut également affecter d'autres processus biologiques régulés par cet axe de signalisation cellulaire majeure tel que mentionné précédemment. Des études subséquentes permettraient de mieux caractériser les effets thérapeutiques du médicament associé à la voie oncogénique de la PI3K/AKT.

Depuis plus de trente ans, peu d'avancées significatives ont été réalisées dans la prise en charge des astrocytomes de grade III et IV tels que les GBM. L'inactivation de PTEN et l'amplification de EGFR sont des anomalies génétiques communément retrouvées dans les glioblastomes et ont pour conséquence d'induire la transduction du signal médié par la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT (Idbaih *et al.*, 2008). Nos résultats indiquent que TLN-4601 inhibe ces deux voies de transduction cellulaire cruciales pour le développement des tumeurs cérébrales, ce qui fait état de son efficacité thérapeutique pour traiter les GBM (figure 3.16).

4.1.3 TLN-4601 induit l'apoptose des glioblastomes humains.

Des expériences ont été réalisées dans le but d'évaluer l'effet du TLN-4601 sur la mort cellulaire via un processus apoptotique. Pour ce faire, l'activité de la caspase-3 induite par des traitements au TLN-4601 a été mesurée à l'aide d'essais enzymatiques. Il est bien connu que ces protéases à cystéine jouent un rôle principal dans la phase d'exécution de l'apoptose en clivant PARP, un substrat protéique dont la fonction est le recrutement d'enzymes participant à la réparation de l'ADN nucléaire (Ray *et al.*, 2002, Glaser et Weller, 2001; Salvesen et Dixit, 1997). Nos résultats font état de la cytotoxicité du TLN-4601 envers les trois modèles de glioblastomes. Toutefois, l'action du médicament semble une fois de plus être beaucoup plus efficace chez les U87 parentales comparativement aux lignées recombinantes. L'immunodétection du clivage de PARP chez les trois lignées cellulaires indique également qu'un traitement au TLN-4601 induit l'apoptose de manière différentielle, puisque des doses plus élevées et des temps de traitement plus longs ont été nécessaires pour entraîner un clivage de PARP moins important chez les lignées recombinantes par rapport aux cellules parentales. Conformément aux résultats précédents, l'immunodétection de la caspase-9 démontre que le clivage protéolytique du domaine pro est beaucoup plus prononcé chez les U87 MG que chez les deux autres lignées cellulaires. Cet effet thérapeutique différentiel est corroboré par une étude rapportant des résultats similaires (Nagane *et al.*, 1998). Les auteurs de cet article démontrent que les variants EGFRvIII surexpriment la protéine Bcl-X_L par rapport à la lignée parentale ce qui se traduit par une protection plus importante des U87 EGFRvIII vis-à-vis l'apoptose. Malgré la résistance des cellules U87 EGFRvIII aux effets thérapeutiques du TLN-4601, il faut mentionner que le médicament provoque la mort des trois modèles de glioblastomes par apoptose. Au niveau moléculaire, ce phénomène semble être à première vue corrélé avec l'inactivation de la voie PI3K/AKT qui est fortement amplifiée dans les tumeurs cérébrales en raison de la délétion de la phosphatase PTEN (Maehama et Dixon, 1999), cependant une caractérisation plus approfondie est essentielle.

Afin d'étudier le rôle de la kinase AKT dans la régulation de l'apoptose induite par le TLN-4601, une de ses cibles cytoplasmiques a été étudiée par immunobuvardage de type western. Dans la littérature, il a été bien établi que AKT phosphoryle BAD sur sa position sérine 136 ce qui induit en partie un effet anti-apoptotique en empêchant son hétérodimérisation avec Bcl-X_L. Par contre, la phosphorylation de la sérine 112 de BAD par la kinase RAF-1 doit aussi être

présente pour permettre aux cellules tumorales d'entamer le processus d'apoptose (Fang *et al.*, 1999). Les résultats indiquent que les deux sites de phosphorylation de BAD sont inhibés à la fin d'un traitement au TLN-4601 chez les U87 MG, ce qui suggère que le médicament augmente la sensibilité de ces cellules au phénomène d'apoptose. Cependant, la modulation à la baisse des sites de phosphorylation de BAD pour les deux autres lignées cellulaires à l'étude semble être plutôt visible à des doses plus fortes que 5 μ M pour les U87 EGFRwt et à 10 μ M pour les U87 EGFRvIII révélant ainsi une résistance plus accrue à l'apoptose des cellules surexprimant la forme mutante du récepteur. Conformément à la littérature, l'inhibition de pBad (ser112) semble être attribuée à la modulation de Raf tandis que celle de pBad (ser136) semble être plutôt imputée à l'inhibition de pAKT. Ces données révèlent que l'effet inhibiteur du TLN-4601 sur les voies de signalisation cellulaire RAS/MAPK et PI3K/AKT affecte non seulement le caractère infiltrant des glioblastomes, mais stimule également leur mort par apoptose (figure 3.16). D'ailleurs, l'apoptose est relevée chez les trois lignées astrocytaires par le clivage dose-dépendant de PARP, mais à des niveaux inférieurs pour les cellules gliales exprimant des formes recombinantes de EGFR. En définitive, l'action pro-apoptotique du médicament semble être préférentielle, car elle est plus prononcée chez les cellules U87 MG que chez les deux autres modèles cellulaires proposés.

Présentement, la recherche clinique s'oriente vers une classification plus précise des gliomes, basée sur la biologie moléculaire et vers des thérapies ciblant les anomalies génétiques impliquées dans le processus de gliomagenèse. Le traitement de ce type de cancer par TLN-4601 semble être une avenue très prometteuse, car ce médicament cible deux voies de transduction cellulaire majeures qui sont associées au développement tumoral. Toutefois, puisque nos résultats indiquent que les glioblastomes humains plus agressifs U87 EGFRvIII semblent être plus réfractaires à l'action du médicament, Thallion Pharmaceutiques a par conséquent décidé d'évaluer l'effet thérapeutique du TLN-4601 sur des patients pour lesquels cette anomalie génétique n'est pas détectée dans le cadre d'essais cliniques de Phase II présentement en cours. Cet ouvrage a donc permis entre autres à cette compagnie de développer un protocole de recherche clinique intégrant le profil génétique des patients atteints de GBM à leur traitement. Les résultats de ces essais, visant à évaluer TLN-4601 comme monothérapie de deuxième ligne chez des patients atteints de GBM, pourrait apporter une lueur d'espoir à ces personnes souffrant de ce cancer du cerveau dévastateur qui jusqu'à ce jour demeure essentiellement incurable.

4.2 Caractérisation de l'action anti-angiogénique du TLN-4601.

4.2.1 *TLN-4601 inhibe le recrutement des cellules endothéliales cérébrales au foyer tumoral.*

L'étroite dépendance entre l'angiogenèse et le développement des glioblastomes fait en sorte que plusieurs industries pharmaceutiques concentrent leurs efforts à développer des thérapies anti-angiogéniques pour ces tumeurs. D'autant plus que les glioblastomes font partie des cancers les plus vascularisés et que ce phénotype tumoral apparaît clairement être corrélé au degré de malignité et au pronostic de la maladie (Leon, Folkerth et Black, 1996). Des essais migratoires avec des cellules endothéliales cérébrales ont été réalisés dans le but de déterminer si TLN-4601 peut inhiber le recrutement des cellules endothéliales au foyer tumoral. En effet, une modulation à la baisse d'environ 50 % du potentiel migratoire des cellules endothéliales est observée en réponse à un milieu conditionné de glioblastomes parentaux enrichis en facteurs pro-angiogéniques suite à un prétraitement des cellules à une concentration de 5 μ M de TLN-4601 par rapport aux conditions contrôles. De telles échelles de grandeurs mettent en évidence les propriétés anti-angiogénique de l'agent anti-cancéreux à de faibles concentrations.

Différents travaux ont montré qu'au niveau moléculaire la néovascularisation des gliomes par les cellules endothéliales est induite suite à la sécrétion de certains facteurs de croissance synthétisés en réponse à des conditions hypoxiques (Liekens, De Clercq et Neyts, 2001; Carmeliet, 2003; Rini et Small, 2005). Ces molécules tumorales, dont la principale est le VEGF, sont responsables d'activer les cellules endothéliales via notamment une régulation positive des voies de signalisation PI3K/AKT et RAS/MAPK (Rini et Small, 2005). De ce point de vue, il a été particulièrement intéressant d'évaluer l'effet du TLN-4601 sur ces voies de transduction cellulaire après leur induction avec du milieu conditionné de U87 MG, un milieu mimant l'environnement des cellules endothéliales lors du développement de la maladie. Nos résultats semblent indiquer que les niveaux de phosphorylation des kinases AKT et ERK sont inhibés de manière significative par le TLN-4601, ce qui suggère par conséquent que le médicament pourrait d'inhiber *in vivo* le recrutement des cellules endothéliales au foyer tumoral en régulant négativement la voie de la PI3K/AKT et de la RAS/MAPK. Cette inhibition de la migration des cellules endothéliales empêcherait entre autres le phénomène d'angiogénèse tumorale indispensable à la progression des cancers cérébraux.

D'autres stratégies sont employées dans l'industrie pharmaceutique dans le but d'inhiber les étapes essentielles de l'angiogenèse telles que l'inactivation de facteurs pro-angiogéniques. Chez les glioblastomes, les principaux facteurs impliqués dans l'angiogenèse sont les protéines de la famille du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (De Boüard et Guillamo, 2005). En condition pathologique, la sécrétion du VEGF dans les régions hypoxiques tumorales établit un gradient de concentration de ce mitogène qui induit l'attraction des vaisseaux sanguins en croissance (Ausprunk et Folkman, 1977; Takano *et al.*, 1996). Les résultats obtenus par analyses RT-PCR quantitatives démontrent que le niveau basal d'ARN_m du VEGF synthétisé par les glioblastomes parentaux est drastiquement diminué suite à un traitement au TLN-4601. L'inhibition de ce facteur promoteur de l'angiogenèse chez les astrocytomes de grades élevés témoigne des propriétés anti-angiogéniques du TLN-4601. De plus, nos résultats sont confirmés par une étude révélant qu'en condition normoxique les niveaux transcriptionnels de VEGF sont régulés à la baisse suite à l'inactivation la voie de la PI3K/AKT ou la voie MEK/ERK/MAPK par des inhibiteurs pharmacologiques (Woods et Cheresch, 2002). Ces données révèlent que l'effet inhibiteur du TLN-4601 sur ces deux voies de signalisation cellulaire pourrait affecter le recrutement des cellules tumorales, non seulement en diminuant le potentiel migratoire des cellules endothéliales, mais en inactivant un des principaux facteurs pro-angiogénique qu'est le VEGF.

Suite aux résultats précédents, des expériences de migration cellulaire ont été effectuées dans le but d'appuyer l'hypothèse d'inactivation de facteurs pro-angiogéniques par le médicament à l'étude. Pour ce faire, des essais migratoires avec des cellules endothéliales cérébrales ont été réalisés en utilisant comme chémoattractant différents milieux conditionnés de U87 MG prétraités au TLN-4601. Ces résultats montrent que la migration des cellules endothéliales est considérablement diminuée avec les milieux conditionnés de U87 MG prétraités au TLN-4601 comparativement à la condition contrôle, suggérant ainsi que le médicament module à la baisse la sécrétion de certains facteurs de croissance tumoraux responsables du recrutement des cellules endothéliales vers le foyer tumoral. En d'autres mots, TLN-4601 semble inhiber indirectement la migration des cellules endothéliales en entravant la synthèse de messagers biochimiques pro-angiogéniques relargués par les glioblastomes parentaux dans leur environnement, classant ainsi TLN-4601 comme un agent anti-angiogénique.

La croissance et le maintien des glioblastomes sont indissociables à un apport sanguin adéquat. L'établissement d'un nouveau réseau de capillaires servant à alimenter la tumeur est

coordonnée par l'interaction complexe de plusieurs facteurs angiogéniques. Le ciblage des facteurs ou des voies impliquées dans l'angiogenèse représente donc une approche potentielle pour le traitement des glioblastomes qui sont des tumeurs fortement vascularisées (Leon, Folkerth et Black, 1997). Nos résultats suggèrent que TLN-4601 fait obstacle à deux étapes essentielles du processus angiogénique en inhibant un des régulateurs clefs de l'angiogenèse, le VEGF, et en inhibant des voies de signalisation activant les cellules endothéliales. Ces propriétés définissent le médicament en tant qu'inhibiteur d'angiogenèse et justifie par le fait même son utilisation dans la lutte contre les GBM.

4.2.2 *TLN-4601 inhibe la tubulogénèse des cellules endothéliales cérébrales.*

La tubulogénèse est caractérisée comme un des mécanismes importants associés à l'angiogénèse. Les cellules endothéliales possèdent la capacité de se différencier en réseau de structure capillaire tridimensionnel sur une matrice de Matrigel. L'utilisation de cette matrice a permis de déterminer que le médicament à l'étude inhibe considérablement la tubulogénèse des cellules endothéliales cérébrales. Ses résultats préliminaires suggèrent que TLN-4601 entraverait la formation de réseau vasculaire lors du développement des tumeurs cérébrales. Il est également à noter que cet effet semble être encore visible en présence de sérum, une condition plus proche des paramètres physiologiques normalement retrouvés dans l'environnement des cellules endothéliales. Les glioblastomes sont malheureusement des tumeurs hautement résistantes aux traitements anticancéreux conventionnels. Les effets multiples du TLN-4601 sur ce type de cancer et son environnement tumoral répertoriés dans cet ouvrage tendent à suggérer une action thérapeutique efficace de l'agent anti-cancéreux contre les glioblastomes. Toutefois, seuls les résultats des essais cliniques présentement en cours pourront supporter ou non cette observation.

4.3 **Sélectivité thérapeutique du TLN-4601.**

4.3.1 *Cytotoxicité sélective du TLN-4601 envers les cellules cancéreuses versus les cellules endothéliales.*

La plupart des agents chimiothérapeutiques présentement disponibles sur le marché s'attaquent non seulement aux cellules cancéreuses, mais également aux cellules saines ce qui engendre de nombreux effets secondaires. La recherche vise donc à développer des médicaments plus ciblés qui sont directement livrés au foyer tumoral. TLN-4601 s'inscrit dans cette nouvelle génération de médicaments anti-cancéreux plus spécifiques. En effet, des données précliniques ont démontré que cette petite molécule farnésylée se lie de manière sélective au récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), une protéine surexprimée dans différents types de tumeurs (Decaudin, 2004). La cytotoxicité du médicament a donc été évaluée respectivement pour les glioblastomes parentaux et les cellules endothéliales à l'aide de dosages enzymatiques de la caspase-3. Selon ces résultats, l'effet cytotoxique du médicament est beaucoup plus important chez les cellules cancéreuses versus les cellules non cancéreuses. Cet effet préférentiel de l'agent

thérapeutique semble être lié à la surexpression du récepteur oncogénique PBR chez les glioblastomes comparativement aux cellules endothéliales. La valeur scientifique de ces données préliminaires, suggérant que la liaison sélective aux PBR conférerait au médicament une action cytotoxique plus spécifique aux tissus cancéreux qu'aux tissus sains, augmenterait considérablement suite à des expériences *in vivo*. À cet égard, des études *in vivo* réalisées à l'aide de modèles orthotopiques ont démontré que le médicament s'accumule préférentiellement au niveau de la tumeur cérébrale plutôt que le cerveau sain dans un rapport 200 pour 1, supportant ainsi cette dernière hypothèse (Gourdeau et al., 2007).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'originalité de cette recherche est d'évaluer l'effet *in vitro* du TLN-4601 sur les GBM en utilisant trois lignées d'astrocytomes humains soit les U87 MG, U87 EGFRwt et les U87 EGFRvIII. Les deux lignées recombinantes possèdent un niveau d'expression du récepteur oncogénique comparable à celui d'une tumeur cérébrale. Dans ce contexte, il a été démontré que TLN-4601 antagonise le caractère infiltrant accru des glioblastomes qui est la cause majeure de la récurrence de cette maladie. D'une part, les résultats présentés dans cet ouvrage semblent indiquer que l'agent anti-cancéreux inhibe ce phénotype tumoral en ciblant deux voies de transduction cellulaire cruciales pour la gliomagenèse, soit la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT. Plus précisément, TLN-4601 affecte les MAPK en entraînant une modulation à la baisse de l'expression protéique de RAF-1 qui se traduit par une diminution des niveaux de phosphorylation de ERK. À la lueur de ses résultats, il est impossible de déterminer si d'autres événements moléculaires précédents la dégradation de RAF-1 sont responsables de l'effet thérapeutique de l'agent anti-cancéreux et c'est pourquoi des expériences supplémentaires permettraient de mieux comprendre son mode d'action en amont de cette cascade moléculaire. Nos résultats démontrent également que le médicament augmente la sensibilité des cellules tumorales à la mort cellulaire via un processus apoptotique. Ce phénomène a été caractérisé par une modulation à la baisse des sites de phosphorylation de BAD, une augmentation de l'activité caspasiqque et un clivage de PARP, bien que les astrocytomes humains U87 EGFRvIII plus agressifs semblent être plus réfractaires aux effets du médicament comparativement aux autres lignées à l'étude. En concordance avec ses résultats, la Société a décidé d'évaluer l'effet thérapeutique du TLN-4601 en fonction du profil génétique EGFR des patients dans le cadre d'un essai clinique de Phase II qui vise à évaluer le médicament comme une monothérapie de deuxième ligne contre les GBM. D'autre part, il a été démontré que le TLN-4601 interviendrait dans le recrutement des CE au foyer tumoral en réduisant leur potentiel migratoire, leur différenciation en structure de type capillaire, ainsi que la synthèse de VEGF par les glioblastomes, un des principaux messagers biochimiques impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Ces données constituent les premières indications classant TLN-4601 en tant qu'agent anti-angiogénique. Une série d'expériences supplémentaires pourrait être envisagée afin de démontrer le potentiel anti-angiogénique de la molécule *in vivo*, ce qui augmenterait la valeur scientifique de ses données. L'inhibition du processus angiogénique par le TLN-4601 semble également être associée à l'inhibition des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT chez

les CE. Finalement, nos résultats témoignent d'une action cytotoxique préférentielle du médicament envers les tissus cancéreux plutôt qu'envers les tissus de l'endothélium vasculaire cérébral, qui s'expliquerait par le fait que cette petite molécule farnésylée se lie de manière sélective au récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), une protéine oncogénique surexprimée chez les glioblastomes selon des analyses par RT-PCR. Des publications récentes décrivent une forte surexpression du PBR dans différents cancers, et certaines présentent PBR comme une excellente cible thérapeutique ou marqueur diagnostique (Maaser et al., 2002; Decaudin, 2004). Ce qui suggère que TLN-4601 est un agent chimiothérapeutique prometteur pour traiter plusieurs autres types de cancers. Les effets multiples du TLN-4601 sur les glioblastomes humains et leur environnement tumoral qui sont répertoriés dans cet ouvrage semblent indiquer que le médicament possède une action thérapeutique efficace contre cette maladie. Néanmoins, seuls les résultats des essais cliniques présentement en cours pourront permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

BIBLIOGRAPHIE

- American Brain Tumor Association. 2004. « A Primer of Brain Tumor : A patient's reference manual ». Des Plaines, ABTA.
- Arenberg, D.A., Strieter, R.M. 1999. « Inflammation: basic principles and clinical correlates ». Lippincott Williams & Wilkins, p. 1015.
- pp. 851-86 Ausprunk, D.H., Folkman, J. 1977. « Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis ». *Microvascular Research*. vol. 14, no. 1, p. 53-65.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N. 2006. « Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response ». *Nature*. vol. 444, no. 7120, p. 756-760.
- Béliveau, R., Gingras, D. 2005. « Les aliments contre le cancer. La prévention du cancer par l'alimentation ». Éditions Trécarré, p. 213.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A. 2002. « Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) ». *Nature*. vol. 417, no. 6885, p. 141-147.
- Bergers, G., Benjamin, L.E. 2003. « Tumorigenesis and the angiogenic switch ». *Nature Review Cancer*. vol. 3, no. 6, p. 4001-4010.
- Berrie, C.P. 2001. « Phosphoinositide 3-kinase inhibition in cancer treatment ». *Expert Opinion on Investigational Drugs*. vol. 10, no. 6, p. 1085-1098.
- Bigner, S.H., Wong, A.J., Mark, J., Muhlbaier, L.H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Bigner, D.D. 1987. « Relationship between gene amplification and chromosomal deviations in malignant human gliomas ». *Cancer Genetics and Cytogenetics*. vol. 29, no. 1, p. 165-170.
- Carmeliet, P. 2003. « Angiogenesis in health and disease ». *Nature Medicine*. vol. 9, no. 6, p. 653-660.
- Chandrasekar, N., Mohanam, S., Gujrati, M., Olivero, W.C., Dinh, D.H., Rao, J.S. 2003. « Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells ». *Oncogene*. vol. 22, no. 3, p. 392-400.
- Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C., Chinkers, M. 1982. « A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles ». *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 257, no. 3, p. 1523-1531.

- Collins, V.P. 2004. « Brain tumours: classification and genes ». *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. vol. 75, Suppl. 2, p. ii2-1.
- Combs, S. E., Gutwein, S., Thilmann, C., Huber, P., Debus, J. Schulz-Ertner, D. 2007. « Stereotactically Guided Fractionated Re-irradiation in Recurrent Glioblastoma Multiforme ». *Journal of Neuro-Oncology*. vol. 82, no. 2, p.167-171.
- De Botiàrd, S., Guillaumo, J.S. Angiogenesis and anti-angiogenic strategies for glioblastoma. 2005. *Bulletin du Cancer*. vol. 92, no.4, p. 360-372.
- Decaudin, D. 2004. « Peripheral benzodiazepine receptor and its clinical targeting ». *Anti-cancer Drugs*. vol. 15, no. 8, p.737-745.
- DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, SA. 2004. « Cancer: Principles and Practice of Oncology ». Lippincott Williams & Wilkins. p. 3120.
- Dorr, R.T., Liddil, J.D. 1991. « Modulation of mitomycin C-induced multidrug resistance in vitro ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. vol. 27, no. 4, p. 290-294.
- Ducray, F. 2008. « Biology of gliomas ». *Cancer Radiothérapie*. vol.12, no. 6-7, p663-668.
- Etienne, J., Clauser, E., Housset, C., Roingeard, P. 2006 « Biochimie génétique, biologie moléculaire ». Masson. p.294.
- Fang, X., Yu, S., Eder, A., Mao, M., Bast. R.C., Boyd, D., Mills, G.B. 1999. « Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway ». *Oncogene*. vol. 18, no. 48, p.6635-6640.
- Feldkamp, M.M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., Guha, A. 1999. « Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens ». *Neurosurgery*. vol. 45, no. 6, p.1442-1453.
- Figarella-Branger, D., Bouvier, C. 2005. « Histological classification of human gliomas: state of art and controversies ». *Bulletin du Cancer*. vol. 92, no. 4, p. 301-309.
- Follézou, J.-Y., Pouillart, P. 1980. « Précis de chimiothérapie anticancéreuse ». Doin, p. 444.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M, Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A. 2007. « Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment ». *Genes and Developpement*, vol. 21, no.21, p. 2683–2710 .
- Garfield, J. 1986. « Present status and future role of surgery for malignant supratentorial gliomas». *Neurosurgical Review*. vol. 9, no. 2, p. 23-25.
- Glaser, T., Weller, M. 2001. « Caspase-dependent chemotherapy-induced death of glioma cells requires mitochondrial cytochrome c release ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*. vol. 281, no. 2, p. 322–327.

- Gourdeau, H., Ibrahim, A., Zehntner, S., Rosa-Neto, P., Bedell, B.J., Falardeau, P. 2007. « Targeted Delivery of ECO-4601 to Brain Tumors in an Orthotopic Model ». 3rd Modern Drug Discovery & Development Summit. San Francisco, CA.
- Grandal, M.V., Zandi, R., Pedersen, M.W., Willumsen, B.M., Van Deurs, B., Poulsen, H.S. 2007. « EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes ». *Carcinogenesis*. vol. 28, no. 7, p. 1408-1417.
- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K.S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., Kuhn, M. 1998. « Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells ». *Infection and Immunity*. vol. 66, no. 11, p.5260-5267.
- Haley, J., Whittle, N., Bennet, P., Kinchington, D., Ullrich, A., Waterfield, M. 1987. « The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription ». *Oncogene Research*. vol.1, no. 4, p.375-3796.
- Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, Jääskeläinen J, Paetau A, Haltia M, Alitalo K. 1995. « Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors ». *The American Journal of Pathology*. vol. 146, no. 2, p.368-378.
- Hlobilková, A., Knillová, J., Bártek, J., Lukás, J., Kolár Z. 2003. « The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN ». *Biomedical Paper of the Medical Faculty of University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. vol. 147, no. 1.p.19-25.
- Hood, J.D., Cheresch, D.A. 2002. « Role of integrins in cell invasion and migration ». *Nature Review Cancer*. vol. 2, no. 2, p. 91-100.
- Hyder, S.M., Stancel, G.M. 1999. « Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins ». *Molecular Endocrinology*. vol. 13, no. 6, p. 806-811.
- Idbaih, A., Marie, Y., Lucchesi, C., Pierron, G., Manié, E., Raynal, V., Mosseri, V., Hoang-Xuan, K., Kujas, M., Brito, I., Mokhtari, K., Sanson, M., Barillot, E., Auriat, A., Delattre, J.Y., Delattre, O. 2008. « BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas ». *International Journal of Cancer*. vol. 122, no. 8, p. 1778-1786.
- Instituts en Recherche du Canada.2005. « Plan stratégique 2001-2005 Instituts des neurosciences, de la santé mentale et de la toxicomanie ». No. de cat. : MR21-35/2005F, ISSN : 0-662-87228-2.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Thun, MJ. 2007. « Cancer statistics, 2007 ». *CA A Cancer Journal for Clinicians* . vol. 57, no. 1, p. 43-66.
- Joy, A.M., Beaudry, C.E., Tran, N.L., Ponce, F.A., Holz, D.R., Demuth, T., Berens, M.E. 2003. « Migrating glioma cells activate the PI3-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis ». *Journal of Cell Science*. vol. 116, Pt 21, p. 4409-4417.
- Karamysheva, A.F. 2008. « Mechanisms of angiogenesis ». *Biochemistry*. vol. 73, no. 7, p. 751-762.

- Kerbel, R.S. 2001. « Clinical trials of antiangiogenic drugs : opportunities, problems, and assessment of initial results ». *Journal of Clinical Oncology*, vol. 19, suppl. 18, p. 45S-51S.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., Von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J.P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., Schackert, G. 2007. « Long-term survival with glioblastoma multiforme ». *Brain*. vol. 130, no. 10, p. 2596-2606.
- Leeder, J.S., Dosch, H.M., Harper, P.A., Lam, P., Spielberg, S.P. 1989. « Fluorescence-based viability assay for studies of reactive drug intermediates ». *Analytical Biochemistry*. Vol. 177, no. 2, p.364-372.
- Leon, S., Folkerth, R., Black, P. 1996. « Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors ». *Cancer*. vol. 77, no. 2, p. 362-72.
- Liekens, S., De Clercq, E., Neyts, J. 2001. « Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* ». vol. 61, no. 3, p.253-p270.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P. 2007. « The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System ». *Acta Neuropathologica*. vol. 114, no. 2, p. 97-109.
- Maehama, T., Dixon, J.E. 1999. « PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase ». *Trends in Cell Biology*. vol. 6, no. 4, p.125-128.
- Maaser, K., Grabowski, P., Sutter, A.P. 2002. « Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer ». *Clinical Cancer Research*. Vol, 8, p. 3205-3209.
- May, L.T., Hill, S.J. 2008. « ERK phosphorylation: spatial and temporal regulation by G protein-coupled receptors ». *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. vol. 40, no. 10, p. 2013-2017.
- Mellinghoff, I.K., Wang, M.Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D.A., Zhu, S., Dia, E.Q., Lu, K.V., Yoshimoto, K., Huang, J.H., Chute, D.J., Riggs, B.L., Horvath, S., Liau, L.M., Cavenee, W.K., Rao, P.N., Beroukhi, R., Peck, T.C., Lee, J.C., Sellers, W.R., Stokoe, D., Prados, M., Cloughesy, T.F., Sawyers, C.L., Mischel, P.S. 2005. « Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors ». *The New England Journal of Medicine*. Vol. 353, no. 19, p.2012-2224.
- Mikkelsen, T., Bjerkvig, R., Laerum, O.D., Rosenblum, M.L. 1998. « Brain tumor invasion : biological, clinical, and therapeutic considerations ». *Wiley-Liss*, p. 464.
- Mishima, K., Johns, T.G., Luwor, R.B., Scott, A.M., Stockert, E., Jungbluth, A.A., Ji, X.D., Suvana, P., Volland, J.R., Old, L.J., Huang, H.J., Cavenee, W.K. 2001. « Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor ». *Cancer Research*. Vol. 61, no. 14, p. 5349-5354.
- Montesano, R., Hall, J. 2000. « Environmental causes of human cancers ». *European Journal of Cancer*. Suppl 8, p. S67-87.

- Morgan, J. 2006. UW-Madison Communications. PR-UWM-06-1.
- Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W.K., Huang, H.J. 1998. « Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases ». *Proceeding of National Academy of Sciences of United States of America*. vol. 95, no. 10, p. 5724-5729.
- Nakajima, A., Yamamoto, Y., Taura, K., Hata, K., Fukumoto, M., Uchinami, H., Yonezawa, K., Yamaoka, Y. 2004. « Beneficial effect of cepharanthine on overcoming drug-resistance of hepatocellular carcinoma ». *International Journal of Oncology*, vol. 24, no. 3, p. 635-645.
- Nishikawa, R., Ji, X.D., Harmon, R.C., Lazar, C.S., Gill, G.N., Cavenee, W.K., Huang, H.J. 1994. « A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity ». *Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America*. vol. 91, no. 16, p. 7727-7731.
- Noel, A., Maillard, C., Rocks, N., Jost, M., Chabottaux, V., Sounni, N.E., Maquoi, E., Cataldo, D., Foidart, J.M. 2004. « Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis ». *Journal of Clinical Pathology*. vol. 57, no. 6, p. 577-584.
- Norden, A.D., Drappatz, J., Wen, P.Y. 2008. « Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas ». *Lancet Neurobiology*. vol. 7, no. 12, p. 1152-1160.
- Ohgaki, H., Kleihues, P. 2007. « Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma ». *The American Journal of Pathology*. vol. 170, no. 5, p.1445-1453.
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C., Folkman, J. 1996. « Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice ». *Nature Medicine*. vol. 2, no. 6, p.689-692.
- Pao, W., Miller, V.A. 2005. « Epidermal Growth Factor Receptor Mutations, Small-Molecule Kinase Inhibitors, and Non-Small-Cell Lung Cancer : Current Knowledge and Future Directions ». *Journal of Clinical Oncology*. vol. 23, no. 11, p. 2556-2568.
- Pedersen, M.W., Meltorn, M., Damstrup, L., Poulsen, H.S. 2001. « The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy». *Annals of Oncology*. vol. 12, no. 6, p.745-760.
- Pepper, M.S., Mandriota, S.J., Vassalli, J.D., Orci, L., Montesano, R. 1997. « Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions ». *Currents Topics in Microbiology Immunology*. vol. 213, Pt. 2, p. 31-67.
- Plate, K.H., Risau, W. 1995. « Angiogenesis in malignant gliomas ». *Glia*. vol. 15, no. 3: p.339-347.
- Ray, S.K., Patel, S.J., Welsh, C.T., Wilford, G.G., Hogan, E.L., Banik, N.L. 2002. « Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiforme: upregulation of calpain and caspase-3 ». *Journal of Neuroscience Research*. vol. 69, no. 2, p. 197-206.

- Reagan, T.J., Bisel, H.F., Childs, D.S. Jr., Layton, D.D., Rhoton, A.L. Jr., Taylor, W.F. 1976. «Controlled study of CCNU and radiation therapy in malignant astrocytoma ». *Journal of Neurosurgery*. vol. 44, no. 2, p. 186-190.
- Rini, B.I., Small, E.J. 2005. « Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma ». *Journal of Clinical Oncology*. vol. 23, no. 5, p. 1028-1043.
- Salvesen, G.S., Dixit, V.M. 1997. « Caspases: intracellular signaling by proteolysis ». *Cell*. vol. 91, no. 4, p. 443-446.
- Sawyers, C.L., Mischel, P.S. 2005. « Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors ». *The New England Journal of Medicine*. vol. 353, no. 19, p. 2012-2024.
- Scappaticci, F.A. 2002. « Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies ». *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, no. 18, p.3906-3927.
- Scoazec, J. 2000. « L'angiogénèse tumorale ». *Annales de Pathologie*. vol. 20, no. 1, p. 25-37.
- See, S.J., Gilbert, M.R. 2007. « Chemotherapy in adults with gliomas ». *Annals Academy of Medicine, Singapore*, Vol. 36, no. 5, p.364-366
- Semenza, G. 2002. « Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1 ». *Biochemical Pharmacology*. vol. 64, no. 5-6, p. 993-998.
- Société Canadienne du Cancer. 2008. « Tumeurs cérébrales : comprendre le diagnostique ». p. 15.
- Stambolic, V., Suzuki, A., De la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., Mak, T.W. 1998. « Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN ». *Cell*. vol. 95, no. 1, p.29-39.
- Stins, M.F., Gilles, F., Kim, K.S. 1997. « Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells ». *Journal of the Neuroimmunology*. vol. 76, no.1-2, p.81-90.
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.J. 2006. « Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial ». *The Lancet Oncology*. vol. 7, no. 5, p. 359-360.
- Nag, S. 2003. « The Blood-brain Barrier: Biology and Research Protocols ». Humana Press Inc, New Jersey, USA, p. 549.
- Suzuki, T., Maruno, M., Wada, K., Kagawa, N., Fujimoto, Y., Hashimoto, N., Izumoto, S., Yoshimine, T. 2004. « Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system ». *Brain Tumor Pathology*. vol. 21, no. 1, p.27-34.
- Takano, S., Yoshii, Y., Kondo, S., Suzuki, H., Maruno, T., Shirai, S., Nose, T. 1996. « Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients ». *Cancer Research*. vol. 56, no. 9, p. 2185-2190.

- Tang, P., Steck, P.A., Yung, W.K. 1997. « The autocrine loop of TGF- α /EGFR and brain tumors ». *Journal of Neurooncology*. vol. 35, no. 3, p. 303-314.
- Tonini, T., Rossi, F., Claudio, P.P. 2002. « Molecular basis of angiogenesis and cancer ». *Oncogene*. vol. 22, no. 42, p. 6549-6556.
- Tonks, N.K., Myers, M.P. 1999. « Structural assets of a tumor suppressor ». *Science*. vol. 286, no. 5447, p.2096-2107.
- Tsatas, D., Kaye, A.H. 2003. « The role of the plasminogen activation cascade in glioma cell invasion: a review ». *Journal of Clinical Neuroscience*. vol. 10, no. 2, p. 139-145.
- Voet, D., Voet, J. 2007. « Biochimie ». De Boeck, p. 1362.
- Wen, S., Stolarov, J., Myers, M.P., Su, J.D., Wigler, M.H., Tonks, N.K., Durden, D.L. 2001. « PTEN controls tumor-induced angiogenesis ». *Proceeding National Academy of Sciences of United States of America*. vol. 98, no.8, p. 4622-4627.
- Woods, S.A., McGlade, C.J., Guha, A. 2002. « Phosphatidylinositol 3'-kinase and MAPK/ERK kinase 1/2 differentially regulate expression of vascular endothelial growth factor in human malignant astrocytoma cells ». *Neuro-Oncology*. vol. 4. no. 4, p.242-252.
- Yao, X.H., Ping, Y.F., Chen, J.H., Xu, C.P., Chen, D.L., Zhang, R., Wang, J.M., Bian, X.W. 2008. « Glioblastoma stem cells produce vascular endothelial growth factor by activation of a G-protein coupled formylpeptide receptor FPR ». *Journal of Pathology*. vol. 215, no. 4, p. 369-376.
- Ziegler, D.S., Wright, R.D., Kesari, S., Lemieux, M.E., Tran, M.A., Jain, M., Zawel, L., Kung, A.L. 2008. « Resistance of human glioblastoma multiforme cells to growth factor inhibitors is overcome by blockade of inhibitor of apoptosis proteins ». *Journal of Clinical Investigation*. vol. 118, no. 9, p. 3109–3122.
- Zou, H., Zhao, S., Zhang, J., Lv, G., Zhang, X., Yu, H., Wang, H., Wang, L. 2007. « Enhanced radiation-induced cytotoxic effect by 2-ME in glioma cells is mediated by induction of cell cycle arrest and DNA damage via activation of ATM pathways ». *Brain Research*. Vol. 1185, p.231-238.

ANNEXE-A

Tableau I : Grades des astrocytomes^{1,2}.

Ce tableau classifie les différentes tumeurs malignes astrocytaires selon leurs caractéristiques histologiques. Le grade des tumeurs est corrélé avec la médiane de survie des patients cinq ans après le diagnostic du cancer.

Grade OM		Caractéristiques	Taux de survie à 5ans ¹
II	Astrocytome diffus	Astrocytes néo-plastiques bien différenciés. Cellularité modérément augmentée, atypie nucléaire occasionnelle. Activité mitotique généralement absente	46,9 %
III	Astrocytome anaplastique	Densité cellulaire importante. Atypie nucléaire. Activité mitotique marquée. Aucune prolifération microvasculaire et ou nécrose	29,7%
IV	Glioblastome multiforme (GBM)	Cellules néo-plastiques mal différenciées et pléomorphes, atypie nucléaire marquée. Activité mitotique vive. Prolifération microvasculaire et/ou nécrose.	3,4%

¹ Département of Neurology, National Neuroscience Insitute (Singapore General Hospital campus, Sinapore)

² Departement, Division of cancer medicine, The university of Texas M.D. Anderson Cancer Center Houston, Texas M.D. Anderson Cancer Center Houston, Texas, USA

Adapté de See et Gilbert, 2007

Tableau II: Récapitulatif de médicaments en essais cliniques ciblant les gliomes malins récurrents.

Quelques agents pharmaceutiques présentement en étude clinique de phase II et III pour les tumeurs cérébrales en récidives sont cités dans ce tableau.

Évolution en essai clinique	Composé	Classe
<i>Phase II</i>	Cisplatine	Dérivé du platine
	Acide cis-rétinoïque	Rétinoïdes
	Tamoxifen	Inhibiteur de la protéine Kinase C
	Thalidomide	Anti-angiogénique
	Irinotecan	Inhibiteur de la topoisomérase I
	Bevazuzimad	Inhibiteur du VEGFR
	Gefitinid	Inhibiteur de l'EGFR
	Erlotinid	Inhibiteur de l'EGFR
	Everolimus	Inhibiteur de mTor
	Sirolimus	Inhibiteur de mTor
	Romidepsin	Inhibiteurs d'histone déacétylase
<i>Phase III</i>	Tf-CRM107	Transferrine humaine conjuguée à une toxine diphtérique mutante
	Hydroxyurée plus imatinib	Imatinid (STI-571) est un inhibiteur du récepteur de facteur de croissance dérivé des plaquettes

Tableau III: Séquence des amorces utilisées lors des RT-PCR ou de la qPCR.

L'ARN total de cellules contrôles ou traitées au TLN-4601 a été isolé suite à une extraction au phénol et chloroforme. Par la suite, ces ARN ont été transcrits en ADNc et amplifiés en une étape par RT-PCR semi-quantitative ou en deux étapes par une RT suivie d'un qPCR. Les amplicons d'ADN ont été visualisés sous une lumière UV suite à une électrophorèse sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium.

Gène	Séquence des amorces	Longueur des amplicons (pb)
<i>EGFR</i>	S 5'-CGT TTG GGA GTT GAT GAC CTT T-3'	98
	AS 5'-GGC TGA GGG AGG CGT TCT -3'	
<i>PBR</i>	S 5'-TCT GGA AAG AGC TGG GAG G-3'	240
	AS 5'-AAG GCC AGC CAG GCC AGG-3'	
<i>GAPDH</i>	S 5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3'	540
	AS 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'	
<i>VEGF-A</i>	S 5'-TGC TGT CTT GGG TGC ATT GG-3'	72
	AS 5'-GGT GCA GCC TGG GAC CAC T-3'	
<i>18S</i>	S 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3'	186
	AS 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'	